

**Auswirkung von inflammatorischem Streß auf die
Genexpression von Immunmediatoren
im Hippokampus**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christof Hasse
aus Lauterbach/Hessen

Marburg/Lahn 1997

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 14.10.1997 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Wesemann

Zweitgutachter: Prof. Dr. B. Kadenbach

Tag der mündlichen Prüfung am: 29.10.97

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1.	Immunmediatoren der Peripherie	2
1.1.1.	Zytokine	2
1.1.1.1.	Tumor-Nekrose-Faktor- α	2
1.1.1.2.	Interleukin-1	3
1.1.1.3.	Interleukin-6	4
1.1.1.4.	Interferon- γ	5
1.1.1.5.	Transforming-Growth-Factor- β	5
1.1.2.	Chemokine	6
1.1.2.1.	CXC-Chemokine	7
1.1.2.1.1.	Interleukin-8	7
1.1.2.1.2.	Growth-Related-Cytokine- α	7
1.1.2.2.	CC-Chemokine	8
1.1.2.2.1.	Macrophage-Inflammatory-Protein-1 α	8
1.1.2.2.2.	Monocyte-Chemoattractant-Protein-1	8
1.1.2.2.3.	RANTES	9
1.2.	Immunkompetente Zellen des ZNS	10
1.2.1.	Astrozyten	10
1.2.2.	Oligodendrozyten	12
1.2.3.	Mikroglia	13
1.3.	Endogene Suppression der Immunantwort	15
1.3.1.	Die HPA-Achse	15
1.3.2.	Immunsuppressive Wirkung von Glukokortikoiden	17
1.3.3.	Zytokininhibition durch endogene Antagonisten	19
1.4.	Der Hippokampus	19
2.	Zielsetzung der Arbeit	21
3.	Material und Methoden	22
3.1.	Tierexperimente	22

3.1.1.	Tiere und Tierhaltung	22
3.1.2.	Adaptation der Tiere	22
3.1.3.	Lipopolysaccharid (LPS)-Applikation	22
3.1.4.	Immobilisationsversuche	23
3.1.5.	Messung der Körpertemperatur	23
3.1.6.	Probenentnahme	25
3.2.	Serologische Untersuchungen	25
3.2.1.	Messung der Leukozytenkonzentration im peripheren Vollblut	25
3.2.2.	Proteinisolierung aus hippocampalem Gewebe	25
3.2.3.	Nachweis proinflammatorischer Zytokine	26
3.2.4.	Bestimmung des Serum-Kortikosterons	26
3.3.	Molekularbiologische Methoden	27
3.3.1.	mRNA-Präparation	27
3.3.2.	cDNA-Synthese	28
3.3.3.	Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	28
3.3.3.1.	Reaktionsansatz	29
3.3.3.2.	Visualisierung der Reaktionsprodukte	30
3.3.4.	Quantitative PCR	31
3.3.4.1.	Aufstellung der eingesetzten Primer	36
3.3.4.1.1.	Primer der „housekeeping“-Gene	36
3.3.4.1.2.	Zytokin-Primer	37
3.3.4.1.3.	Chemokin-Primer	39
3.3.4.1.4.	Zytokin-Rezeptor-Primer	40
3.3.4.1.5.	Primer der Transkriptionsfaktoren	43
3.3.4.1.6.	Übrige Primer	44
3.4.	Immunohistochemische Identifizierung von Leukozyten im hippocampalen Gewebe	45
3.5.	Statistische Auswertung	46
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Untersuchungen zu inflammatorischem Streß	47
4.1.1.	LPS als Induktor eines inflammatorischen Stresses	47
4.1.2.	Leukozytenzahl im Vollblut und Milzgewicht nach LPS-Gabe	47
4.1.3.	Einfluß von LPS auf die Körpertemperatur	49

4.1.4.	Proinflammatorisches TNF- α , IL-1 β und IL-6 im Serum	51
4.1.5.	Serum-Kortikosteron nach intraperitonealer LPS-Applikation	54
4.1.6.	Genexpression im hippokampalen Gewebe	56
4.1.6.1.	Konstitutiv exprimierte Gene	56
4.1.6.1.1.	Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase-Expression	56
4.1.6.1.2.	β -Aktin-Expression	58
4.1.6.1.3.	Lysozym-Expression	60
4.1.6.2.	Expression von Zytokinsynthese-relevanten Transkriptionsfaktoren und Onkogenen	61
4.1.6.2.1.	Expression von NF- κ B	62
4.1.6.2.2.	Expression von I- κ B	63
4.1.6.2.3.	Die Expression von c-fos und c-jun	65
4.1.6.3.	Expression des Mineralokortikoid-Rezeptors (MCR)	68
4.1.6.4.	Zytokin-Expression	69
4.1.6.4.1.	Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression	69
4.1.6.4.2.	Interleukin-1 β -Expression	72
4.1.6.4.3.	Interleukin-6-Expression	74
4.1.6.4.4.	Expression von Interleukin-2 und Interleukin-4	76
4.1.6.4.5.	Expression von Transforming-Growth-Factor- β	77
4.1.6.5.	Expression von Chemokin-mRNA	80
4.1.6.5.1.	Expression von MIP-1 α	80
4.1.6.5.2.	Expression von RANTES	81
4.1.6.5.3.	Expression von MCP-1	83
4.1.6.5.4.	Expression von Gro- α	85
4.1.6.6.	Zytokin-Rezeptor-Expression	87
4.1.6.6.1.	TNF- α -Rezeptor-Expression	87
4.1.6.6.2.	Interleukin-1- β -Rezeptor-Expression	89
4.1.6.6.3.	Interleukin-6-Rezeptor-Expression	90
4.1.6.6.4.	Interleukin-2-Rezeptor-Expression	91
4.1.6.6.5.	Interleukin-4-Rezeptor-Expression	93
4.1.6.7.	Nachweis von CD3-mRNA im Hippokampus	94
4.1.7.	Immunhistochemische Identifizierung von Leukozyteninfiltraten im hippokampalen Gewebe	96
4.1.7.1.	Intravaskuläre Monozyten und perivaskuläre Makrophagen	97

4.1.7.2.	T-Zellen im Hirnparenchym	98
4.2.	Immunsuppressive Mechanismen im Hippokampus nach Immobilisationsstreß	100
4.2.1.	Periphere Effekte von Immobilisationsstreß	100
4.2.1.1.	Serum-Kortikosteron nach Immobilisationsstreß	100
4.2.2.	Genexpression im hippokampalen Gewebe des ZNS nach Immobilisationsstreß	101
4.2.2.1.	Expression der Kontrollgene	101
4.2.2.1.1.	Lysozm-Expression	102
4.2.2.1.2.	β -Aktin-Expression	103
4.2.2.2.	Expression von Faktoren des NF- κ B/I- κ B-Systems	104
4.2.2.2.1.	Expression von NF- κ B	104
4.2.2.2.2.	Expression von I- κ B	105
4.2.2.3.	Expression des Mineralkortikoidrezeptors (MCR)	106
5.	Diskussion	107
5.1.	Pyrogene Effekte peripherer LPS-Applikation	108
5.2.	Proinflammatorische Zytokine bei Entzündungen in der Peripherie	109
5.3.	LPS-induzierte Aktivierung der HPA-Achse	112
5.4.	Erhöhte β -Aktin-Expression im Hippokampus nach inflammatorischem und Immobilisations-Streß	115
5.5.	Expression proinflammatorischer Zytokine im ZNS	116
5.6.	Effekte von Zytokinen auf Neurotransmittersysteme	121
5.7.	Basale T-Zell-Infiltration des hippokampalen Gewebes	123
5.8.	Immunsuppressive Mechanismen im Hippokampus	124
6.	Zusammenfassung	127
7.	Literaturverzeichnis	129

1. Einleitung

Das Zentralnervensystem (ZNS) galt lange Zeit als immunologisch privilegiertes Organ, da es zum einen nicht von lymphatischen Gefäßen versorgt wird, zum anderen durch eine scheinbar hermetische Blut-Hirnschranke (BHS) vom Einfluß immunkompetenter Zellen des peripheren Blutstroms abgeschottet wird. So stehen die Zellen des ZNS nicht im direkten Kontakt mit Leukozyten, jenen Zellen, welche in der Peripherie für eine Immunantwort verantwortlich sind. Dennoch ist bekannt, daß bei einer Entzündung peripherer Organe Mediatoren freigesetzt werden und anschließend spezifische Effekte im ZNS hervorrufen. Neben der Induktion von Fieber, als Beispiel für den Eingriff in das temperaturregulatorische Zentrum, werden schlafinduzierende Substanzen freigesetzt und Hormone ausgeschüttet, die immunsuppressiv wirken und eine Überreaktion der peripheren Immunantwort verhindern.

Für eine Signaltransduktion von der Peripherie zum ZNS können mehrere Mechanismen in Frage kommen:

- lösliche Mediatoren, freigesetzt von immunkompetenten Zellen der Peripherie, binden an spezifische Rezeptoren von Zellen der Blut-Hirnschranke, welche ihrerseits das Signal an das ZNS weiterleiten,
- lösliche Mediatoren gelangen über einen Transportmechanismus direkt in das ZNS,
- aktivierte Zellen des peripheren Immunsystems durchdringen die Blut-Hirnschranke und kommunizieren durch Zell-Zell-Kontakt direkt mit Zellen des ZNS oder stimulieren diese durch die Abgabe löslicher Mediatoren.

1.1. Immunmediatoren der Peripherie

Zur gegenseitigen Stimulation immunkompetenter Zellen kommt es entweder durch unmittelbaren Zell-Zell-Kontakt oder durch die Freisetzung von löslichen Mediatoren, welche an spezifische Rezeptoren immunologisch relevanter Zielzellen binden.

1.1.1. Zytokine

Zu diesen Mediatoren zählen die Zytokine, Polypeptide aus 100 - 200 Aminosäuren, die einen regulatorischen Einfluß beim Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Immunantwort haben. Während lange Zeit die Zytokine nur als Signaltransmitter zur Kommunikation zwischen Leukozyten galten, haben Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt, daß das Zentralnervensystem mit seinen Zytokinrezeptoren auf Signale aus der Peripherie reagiert und darüberhinaus über eine eigene Zytokinproduktion fest im Zytokinnetzwerk verankert ist. Im folgenden sollen die Zytokine kurz dargestellt werden, die einen sicheren oder wahrscheinlichen Einfluß auf das Zentralnervensystem aufweisen.

1.1.1.1. Tumor-Nekrose-Faktor- α

Tumorabtötung in vitro war die erste beschriebene Eigenschaft, die dieses Zytokin charakterisiert, welches in der α - und β - Form produziert wird (Beutler et al., 1985). Der im murinen und humanen System besser bekannte Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), ein 17 kDa Polypeptid, wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sezerniert, wenn sie beispielsweise mit LPS bzw. Interferon- γ stimuliert werden (Beutler et al., 1986; Gifford et al., 1987). Aber auch T-Lymphozyten (Cuturi et al., 1987), Astrozyten und Microglia sind als TNF- α -Produzenten bekannt. TNF- α weist ein breites Wirkungsspektrum auf. In Monozyten und Makrophagen wird die Interleukin-1 β -Produktion

gefördert. Makrophagen benötigen zu ihrer Interferon- γ induzierten Aktivierung eine TNF- α /Interleukin-1 β -Vorstimulation, später reagieren sie auf TNF- α mit Interleukin-6- und Prostaglandin-Freisetzung. Aktivierte Lymphozyten zeigen bei TNF- α -Behandlung eine Induktion der Interleukin-2-, Interleukin-2-Rezeptor- und Interferon- γ -Expression (Yokota et al., 1988). In neutrophilen Granulozyten wird durch TNF- α die Adhärenz am Gefäßendothel (Bohnsack et al., 1990) und die Phagozytose gefördert (Livingston et al., 1989). TNF- α erhöht die Permeabilität von Endothelzellen (Brett et al., 1989) und induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf diesen Zellen (Pober et al., 1986). Durch die verstärkte Adhärenz von Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen an der Endothelzelloberfläche (Pohlman et al., 1986) wird die transendotheliale Migration dieser Immunzellen und die Etablierung von leukozytenreichen Infiltraten ermöglicht. Ein weiterer immunstimulatorischer Effekt von TNF- α ist die Expression von MHC-Molekülen der Klasse I und II auf verschiedenen Immunzellen, unter anderem auch auf Astrozyten und Mikroglia. TNF- α (Saper und Breder, 1992) stellt neben Interleukin-1 β und Interleukin-6 (Klir et al., 1993) das wichtigste endogene Pyrogen dar, dessen fieberinduzierender Effekt auf der Produktion von Prostaglandin-E₂ in hypothalamischen Nervenzellen beruht.

TNF- β wird hauptsächlich von antigenaktivierten T-Zellen, beispielsweise nach Infektion durch das humane T-Zell-Leukämievirus (HTLV), freigesetzt (Paul et al., 1988).

1.1.1.2. Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1) existiert in zwei Formen, dem Interleukin-1 α (Lomedico, 1984) und dem Interleukin-1 β (Auron, 1984). Beide Zytokine sind Produkte verschiedener Gene (Clark, 1986), weisen etwa 30 % Homologie auf, binden an den gleichen Rezeptor und haben ähnliche physiologische Effekte. Nach der Proteinbiosynthese liegt IL-1 zunächst als inaktive bzw. teilaktive Form vor, bis daraus durch Proteasen das biologisch aktive, reife Protein

hervorgeht (Dinarello, 1991). Das 17 kDa große IL-1 β wird in erster Linie von aktivierten Makrophagen synthetisiert und freigesetzt. Als weitere Sezernenten sind nach Stimulation noch B-Zellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Keratinozyten, Mikroglia und Astrozyten bekannt (Arai et al., 1990; di Giovine et al., 1990). IL-1 β ist der wichtigste Faktor für die T-Zellaktivierung, da es in diesen Zellen die Interleukin-2- und Interleukin-2-Rezeptor-Expression induziert und damit ihre Proliferation einleitet. Zusammen mit weiteren Zytokinen fördert IL-1 β das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen. Außerdem fördert dieses Zytokin bei einer Immunantwort die Produktion von Prostaglandinen, Kollagenasen und Phospholipase A₂. Auf Endothelzellen hat IL-1 β durch Steigerung der Leukozytenadhäsion einen ähnlichen Effekt wie TNF- α . Einen endogenen Inhibitor stellt die lösliche Form des zellmembranständigen IL-1 β -Rezeptors dar, welcher, enzymatisch, abgespalten als löslicher, 47 kDa großer Antagonist im Serum das IL-1 β komplexieren und so seine Bindung an weitere Rezeptoren verhindern kann (Giri, 1990, Symons, 1991).

1.1.1.3. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6), ein pleiotropes, 26 kDa großes Zytokin, ist ebenfalls wie IL-1 β und der TNF- α an der Regulation inflammatorischer Prozesse und immunologischer Reaktionen beteiligt. Es wird von einer Reihe Zellen wie Fibroblasten, Monozyten, B-Zellen, T-Zellen, Endothelzellen, Mikroglia und Astrozyten sezerniert. Die Freisetzung wird, je nach Zelltyp, von anderen Zytokinen wie z.B. IL-1 β , TNF- α und Interferon- γ induziert. Der Haupteffekt von IL-6 ist die Ausdifferenzierung der aktivierten B-Zelle zur Immunglobulin-sezernierenden Plasmazelle. In Hepatozyten wird durch IL-6 die Produktion einiger Plasmaproteine wie die des Fibrinogens und des C-reaktiven-Proteins (CRP), eines Akute-Phase-Proteins, eingeleitet.

1.1.1.4. Interferon- γ

Das 17 kDa große Interferon- γ (IFN- γ) wird nur von aktivierten T-Helfer-Zellen (CD4⁺), zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) und von NK-Zellen produziert. Aktivierung der mononukleären Phagozytose, Steigerung der Sauerstoffradikalproduktion von Makrophagen, Stimulation zur T- und B-Zell-Differenzierung sind einige Effekte, die IFN- γ zugeschrieben werden. Die IFN- γ -induzierte Modulation der MHC-Expression (Klasse I und II) konnte auch Glia-Zellen nachgewiesen werden (Suzumura et al., 1987).

1.1.1.5. Transforming-Growth-Factor- β

Der Transforming-Growth-Factor- β (TGF- β) ist ein 35-kDa Peptid, welches auch von Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten sezerniert werden kann (Assoian et al., 1983; Kehrl et al., 1986; Assoian et al., 1987). Wie der Name des Faktors anzeigt, spielt TGF- β eine bedeutende Rolle beim Zellwachstum. Dabei wird durch TGF- β die Produktion von Fibronektin und Kollagen sowie deren Einbau in die extrazelluläre Matrix gefördert (Ignotz und Massagué, 1987). TGF- β hebt sich in seinen Eigenschaften von den übrigen, eher proinflammatorischen Zytokinen ab, da es eine Reihe inhibitorischer Funktionen ausübt. So konnte gezeigt werden, daß TGF- β durch Interaktion mit dem IL-1-Rezeptor die IL-1-abhängige Lymphozytenproliferation hemmt (Wahl et al., 1988). In TGF- β -vorbehandelten Makrophagen wird bei LPS-Stimulation die transkriptionale Induktion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α unterdrückt (Kitamura et al., 1996). Die bei Studien an Knochenmarks-Makrophagen gemachten Beobachtungen, daß TGF- β als ein potenter Suppressor der MIP-1 α -Expression fungiert und MIP-1 α wiederum die TGF- β -Produktion induziert, läßt vermuten, daß es sich bei den TGF- β /MIP-1 α -Wechselwirkungen um aufeinander abgestimmte Komponenten eines Regelsystem handelt (Maltman et al., 1996). Fabry et al. simulierten mit einer Endothelzell/Astrozyten-Schicht eine Blut-Hirnschranke und konnten nachweisen, daß TGF- β die Migration von Leukozyten durch einen LPS- bzw.

TNF- α -stimulierten Zellverband hemmt (Fabry et al., 1995). An aktivierten Endothelzellen ließ sich zeigen, wie TGF- β durch Suppression der E-Selektin- und IL-8-Expression beide für die Leukozytenmigration notwendigen Faktoren inhibiert (Smith et al., 1996).

Nach diesen Befunden fungiert TGF- β als Antagonist einer Chemokin-induzierter Leukozytenmigration.

1.1.2. Chemokine

Innerhalb der Zytokinfamilie bilden Chemokine (von engl.: chemoattractant cytokines) eine eigene Untergruppe. Es sind Proteine relativ niedrigen Molekulargewichtes zwischen 7 und 16 kDa, deren gemeinsame Eigenschaft in der chemotaktischen Wirkung gegenüber Leukozytensubpopulationen zu finden ist (Oppenheim, 1993; Schall und Bacon, 1994). Veränderungen der Zelladhärenz durch Expression von Zelloberflächenmolekülen (Adhäsinen) und gesteigerte Zellmobilität veranlassen chemokinaktivierte Zellen zu einer gezielten Migration entlang des Chemokin-Gradienten in Richtung auf einen Entzündungsherd. Da Chemokine von Zellen erst auf einen Stimulus proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF- α freigesetzt werden, sind sie hinsichtlich ihres Erscheinungszeitpunktes in der Aktivierungskaskade als sekundäre proinflammatorische Zytokine zu bezeichnen (Graves und Jiang, 1995). Chemokine lassen sich aufgrund von vier konservierten Zysteinresten in ihrer Struktur nochmals in drei Gruppen unterteilen.

CXC-Chemokine, bzw. α -Chemokine, besitzen zwischen zwei Zysteinresten eine variierende Aminosäure, während in CC-Chemokinen die Zysteine direkt benachbart sind (Oppenheim, 1991). Dem bisher einzigen charakterisierten C-Chemokin (γ -Chemokin), Lymphotaktin, fehlen zwei der Zysteinbausteine (Kelner et al., 1994). In der folgenden Beschreibung einzelner Chemokine sind nur diejenigen aufgeführt, welche in der Ratte bisher charakterisiert werden konnten.

1.1.2.1. CXC-Chemokine

CXC-Chemokine entfalten ihre chemotaktische Wirkung hauptsächlich bei Neutrophilen, während Lymphozyten und Basophile wesentlich schwächer reagieren (Schall et al., 1994).

1.1.2.1.1. Interleukin-8

Den klassischen Vertreter der CXC-Chemokine stellt das Interleukin-8 (IL-8) dar. Erstmals isoliert und charakterisiert wurde es aus Überständen aktivierter Monozyten (Walz et al., 1987). „neutrophil activating protein 1“ (NAP-1) war die erste Bezeichnung dieses Chemokins, was deutlich macht, daß die erste nachgewiesene chemotaktische Wirkung Neutrophile als Zielzellen ansprach (Huber et al., 1991). So stimuliert IL-8 hauptsächlich die Chemotaxis von Neutrophilen, nicht jedoch von Basophilen, Eosinophilen oder Lymphozyten (Leonard et al., 1991), wobei es zur Reorganisation des Zytoskelettes, Expression von Adhäsinen, Exozytose von Granulaproteinen und Auslösung des „Oxidativen Burst“ kommt. Sezerniert wird IL-8 vor allem von aktivierten Monozyten, Endothel- sowie Epithelzellen (Graves und Jliang, 1995). Ein dem IL-8 homologes Protein der Ratte ist noch nicht bekannt.

1.1.2.1.2. Growth-Related-Cytokine- α

Mit Gro- α , - β und - γ umfaßt die Gro-Gruppe eine Reihe von Chemokinen, deren Namen von der Beobachtung hergeleitet wurde, daß diese Zytokine eine bedeutende Rolle bei Wachstumsprozessen („growth-related cytokine“) spielen. Der Vertreter Gro- α weist mit Chemotaxisinduktion, Zytoskellveränderungen, Exozytose und Auslösen des „Oxidativen Burst“ in Neutrophilen Parallelen zu IL-8 auf. Als Gro-Produzenten sind Monozyten, Lymphozyten, Neutrophile, Fibroblasten, Keratinozyten sowie Epithelzellen identifiziert worden (Baggiolini et al., 1994).

1.1.2.2. CC-Chemokine

CC-Chemokine üben hauptsächlich einen chemotaktischen Stimulus auf Monozyten und T-Zellen aus. Basophile, Eosinophile und NK-Zellen sprechen schwächer an (Schall und Bacon, 1994).

1.1.2.2.1. Macrophage-Inflammatory-Protein-1 α

Aktivierte Monozyten, T-, B- und Mast-Zellen exprimieren das „macrophage inflammatory protein-1“ (MIP-1), welches als α - und β -Form in Erscheinung tritt (Lukacs et al., 1994). Von beiden Formen am besten charakterisiert ist das auf Monozyten (Lukacs et al., 1994), T-Lymphozyten (Taub et al., 1993), Eosinophile (Rot et al., 1992) und Basophile (Alam et al., 1992) chemotaktisch wirkende MIP-1 α , das außerdem die Degranulation von Eosinophilen (Rot et al., 1992) und die Histaminfreisetzung (Alam et al., 1992) stimuliert. Eine von Grove und Plumb (1993) beschriebene Bindungsstelle für NF- κ B läßt eine Inhibition durch Glukokortikoide vermuten.

1.1.2.2.2. Monocyte-Chemoattractant-Protein-1

Das „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) wird hauptsächlich von Monozyten freigesetzt. Seine Expression läßt sich durch Mitogene wie LPS und PHA sowie durch proinflammatorische Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ induzieren (Standiford et al., 1991). Auf MCP-1 als chemotaktischen Stimulus sprechen in erster Linie Monozyten an, wobei es zur Hochregulation von Adhäsinen durch verstärkte Expression von CD11b und CD11c (Jiang et al., 1992) führt, den „Oxidativen Burst“ einleitet und zur Degranulation führen kann (Rollins et al., 1991). Nach Carr spielt MCP-1 eine große Rolle bei der T-Zellmigration (Carr et al., 1994), und Maghazachi konnte seine Wirkung auf NK-Zellen (Maghazachi et al., 1994) nachweisen. Im ZNS wird MCP-1 von aktivierten Astrozyten bei mechanischer Gewebszerstörung (Glabinski et al.,

1996) und experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) freigesetzt (Ransohoff et al., 1993).

1.1.2.2.3. RANTES

Die Beobachtung, daß dieses Chemokin in aktivierten T-Zellen exprimiert wird, gab RANTES („regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) seinen Namen (Schall et al., 1988). Neben T-Zellen konnten noch Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen (Stellato et al., 1995) sowie Fibroblasten als Produzenten nachgewiesen werden (Rathanaswami et al., 1993). Chemotaxis-aktivierend wirkt RANTES bei Monozyten, T-Lymphozyten, Eosinophilen (Schall et al., 1991; Miller und Krangel, 1992; Taub und Oppenheim, 1994; Kameyoshi et al., 1994), NK-Zellen (Maghazachi et al., 1994) und Basophilen (Bacon et al., 1994).

Bei intrakranialer Injektion von 1µg RANTES konnte eine signifikante Monozyten-Rekrutierung in den Meningen, nicht jedoch im Parenchym festgestellt werden. Eine Ansammlung von CD4⁺-Zellen (T_H1-Zellen) nicht-aktivierten Zustands (IL-2-Rezeptor negativ) wie nach intradermaler Injektion blieb jedoch aus (Bell et al., 1996). Im Fall HIV-induzierter AIDS-Enzephalitis konnte neben MIP-1α, MCP-3 und IP-10 auch RANTES im ZNS nachgewiesen werden (Sasseville et al., 1996).

1.2. Immunkompetente Zellen des ZNS

Die wichtigsten Zellen im ZNS, die an einer Immunantwort beteiligt sein können, sind die Glia-Zellen. Die Population der Glia-Zellen läßt sich im wesentlichen in zwei Gruppen einteilen: die Makroglia, zu denen Astrozyten, Oligodendrozyten und Zellen des Ependyms zählen und die Mikroglia.

1.2.1. Astrozyten

Die Astrozyten stellen die größte Subpopulation der Glia-Zellen dar. Im Säugerhirn sind 10 mal mehr Astrozyten als Neurone vorhanden. Charakterisieren lassen sich diese Zellen über GFAP (glial fibrillary acidic protein), einem Astrozyten-spezifischen 49 kDa Protein (Bignami, 1972). Die Hauptaufgabe der Zellen besteht in der Regulation der extrazellulären Elektrolytkonzentrationen und des Wassergehaltes im ZNS (Tower, 1973). Astrozyten spielen eine große Rolle beim Neurotransmittermetabolismus, indem sie in großen Mengen γ -Aminobuttersäure (GABA) aufnehmen und durch ihre GABA-Transaminase metabolisieren (Hertz, 1978) bzw. Glutamat durch ihre Glutamin-Synthetase in Glutamin umsetzen (Norenberg, 1979).

Es darf angenommen werden, daß Astrozyten bei inflammatorischen Prozessen im ZNS eine wesentliche Funktion übernehmen. So stehen Astrozyten morphologisch in engem Kontakt mit den Endothelzellen, welche die Blut-Hirn-Schranke bilden und regeln vermutlich die Permeabilität dieser Barriere zwischen ZNS und peripherem Blutstrom. Dabei stimulieren vermutlich von Astrozyten freigesetzte Mediatoren die Endothelzellen zur Expression von Adhäsinen. An diesen bleiben an der Gefäßwand vorbeierollende Leukozyten hängen und werden zum Durchtritt (Diapedese) angeregt (Janzer, 1987) (Abb. 1).

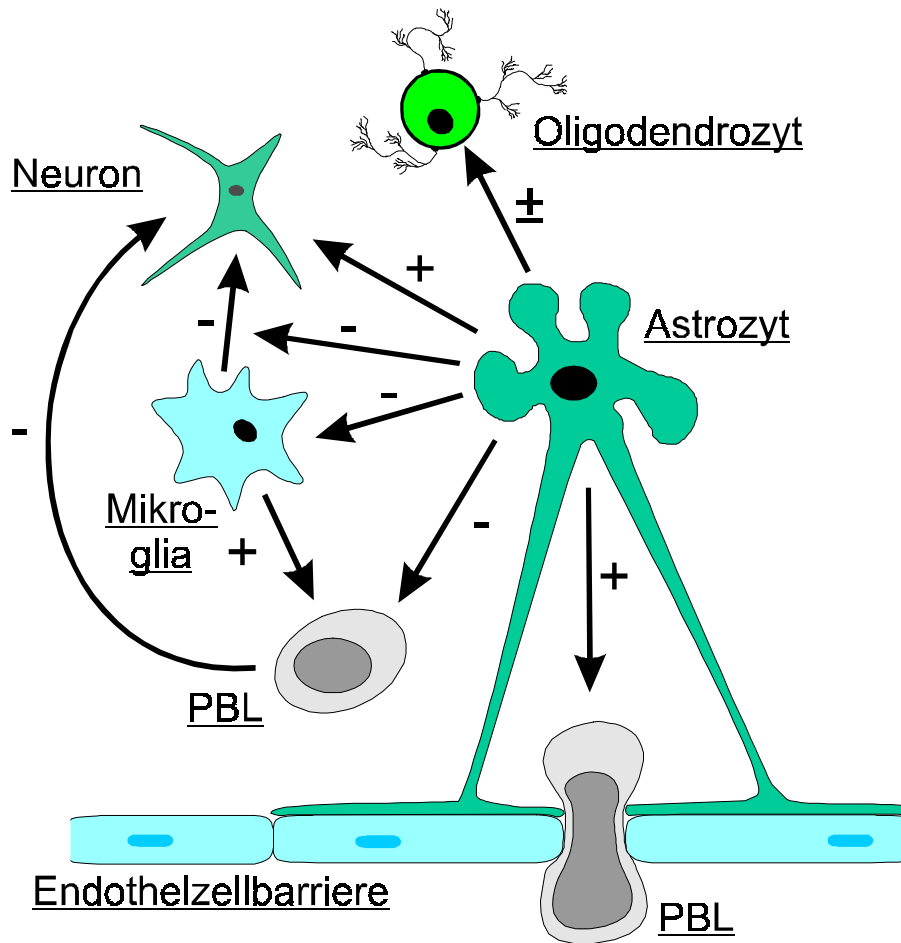


Abb. 1: Interaktion von Astrozyten mit benachbarten Zellen (+ = aktivierende, - = inhibierende bzw. destruktive Eigenschaften, PBL= periphere Blutleukozyten, modifiziert nach Mucke und Eddleston, 1993)

Bei Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen zeigen Astrozyten eine breites Reaktionsspektrum. Mit IFN- γ oder IL-1 β stimulierte Astrozyten exprimieren MHC-Moleküle der Klasse I und II (Vass und Lassmann, 1990) sowie das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Frohman et al., 1989). Die Behandlung dieser Zellen mit einer IFN- γ /IL-1 β -Kombination führt neben einer gesteigerten TNF- α -Expression (Chung und Benveniste, 1990) zu einer Hochregulation des hochaffinen TNF- α -Rezeptors (Benveniste et al., 1989), wobei sich herausstellte, daß zunächst die Zellen von einem reinen IFN- γ -Signal vorstimuliert werden müssen, bevor IL-1 β zu einer effektiven TNF- α -Produktion führt. Eine Stimulation der Astrozyten mit TNF- α selbst hat neben

neuer TNF- α -mRNA-Expression eine IL-6, G-CSF- und GM-CSF-Freisetzung zur Folge (Benveniste et al., 1990; Malipiero et al., 1990). Es konnte gezeigt werden, daß LPS in Lewis-Ratten IFN- γ -unabhängig Astrozyten zur Produktion von TNF- α und IL-6 anregt (Benveniste et al., 1992). Der Astrozyten-TNF- α kann bei Einwirkung auf Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke deren Permeabilität verändern (Brett et al., 1989), sowie durch induzierte ICAM-1-Expression (Pober et al., 1986) die Adhäsion von Lymphozyten und Monozyten an das Gefäßendothel verstärken (Pohlman et al., 1986) und die IL-1 β - bzw. IL-6-Produktion einleiten (Jirik et al., 1989). HIV-1-infizierte Astrozyten exprimieren, wie Eddleston zeigen konnte, TGF- β 1, ein multifunktionales Zytokin, welches in den frühen Phasen einer Immunantwort zunächst die Monozytenmigration stimuliert (Eddleston et al., 1993), später die Bindungsneigung von Leukozyten an das Endothel herabsetzt, die Makrophagenaktivität reduziert und TNF- α -Effekte antagonisiert (Shull et al., 1992). Untersuchungen von Glabinski et al. (1996) konnten kürzlich am adulten Rattenhirn nachweisen, daß in Astrozyten bei einer mechanischen Hirnverletzung sowohl die mRNA als auch das Protein vom Chemokin MCP-1 signifikant ansteigt. Das läßt sich mit der Beobachtung Hayashis begründen, daß Zytokine in Astrozyten zur MCP-1-Expression führen (Hayashi et al., 1995). Freigesetztes MCP-1 könnte auf diese Weise mononukleäre, phagozytierende Zellen der Peripherie zu jenen Stellen im ZNS locken, wo es zu Zellschädigungen gekommen ist. Zu einer erhöhten RANTES- bzw. MIP-1 α -Expression ist es im Modell der mechanischen Hirnverletzung nicht gekommen (Glabinski et al., 1996).

1.2.2. Oligodendrozyten

Die Aufgabe der Oligodendrozyten besteht in der Bereitstellung von Myelin zur Isolation von Nervenfasern, was zur Effizienz der Reizweiterleitung beiträgt (Morell und Norton, 1980). Immunhistochemisch können Oligodendrozyten über ihren hohen Myelingeht in der Zellmembran

identifiziert werden (Raff et al., 1978). Neben der Remyelinisierung geschädigter Neurone spielen anscheinend Oligodendrozyten keine große Rolle bei der Immunabwehr des ZNS, obwohl sie als Zielzellen einer Reihe von Zytokinen wie IL-1 β (Saneto et al., 1987), IL-2 (Benveniste und Merrill, 1986) TNF- α (Selmaj und Raine, 1988) und TNF- β (Selmaj et al., 1991) in Frage kommen.

1.2.3. Mikroglia

Mikroglia machen etwa 10% der Gesamtgliazellpopulation aus und werden als Gewebsmakrophagen des Hirns bezeichnet (Perry und Gordon, 1988). Es wird vermutet, daß die Mikroglia, aus dem mesodermalen Gewebe stammend, im Knochenmark heranreift und nach der Vaskularisierung in das Gehirn einwandert (Hickey und Kimura, 1988). Mikroglia läßt sich immunohistochemisch anhand einer Reihe von Zelloberflächenmarkern wie Immunglobulin-Fc-Rezeptoren (Perry et al., 1985), Komplement-Rezeptoren vom Typ III (Giulian und Baker, 1986) und beta-2-Integrinen (Akiyama und McGeer, 1990) identifizieren. Die Hauptaufgaben dieses Zelltyps bestehen in der Phagozytose von Zelltrümmern und der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies. Vermutlich spielt die Mikroglia eine große Rolle als Antigen-präsentierende Zelle (APC) im ZNS (Lowe et al., 1989; Jiang et al., 1995).

In der Mikroglia von Patienten mit AIDS-induzierter Demenz konnte zudem TGF- β nachgewiesen werden (Wahl et al., 1991). LPS-stimulierte Ratten-Mikroglia reagiert mit der Freisetzung von IL-1 β (Giulian et al., 1986). In der Maus-Mikroglia wurde nach LPS- bzw. IFN- γ -Behandlung eine TNF- α -Produktion nachgewiesen (Frei et al., 1987). Im Gegensatz zu Astrozyten konnte eine IL-6-Produktion der Mikroglia bei Mäusen nur bei Virusinfekten und M-CSF-Stimulation festgestellt werden, nicht jedoch bei IL-1 β - bzw. TNF- α -Stimulation (Frei et al., 1989).

Die Kommunikation der Glia-Zellen untereinander und mit Leukozyten über Zytokine ist zusammenfassend in Abbildung 2 dargestellt.

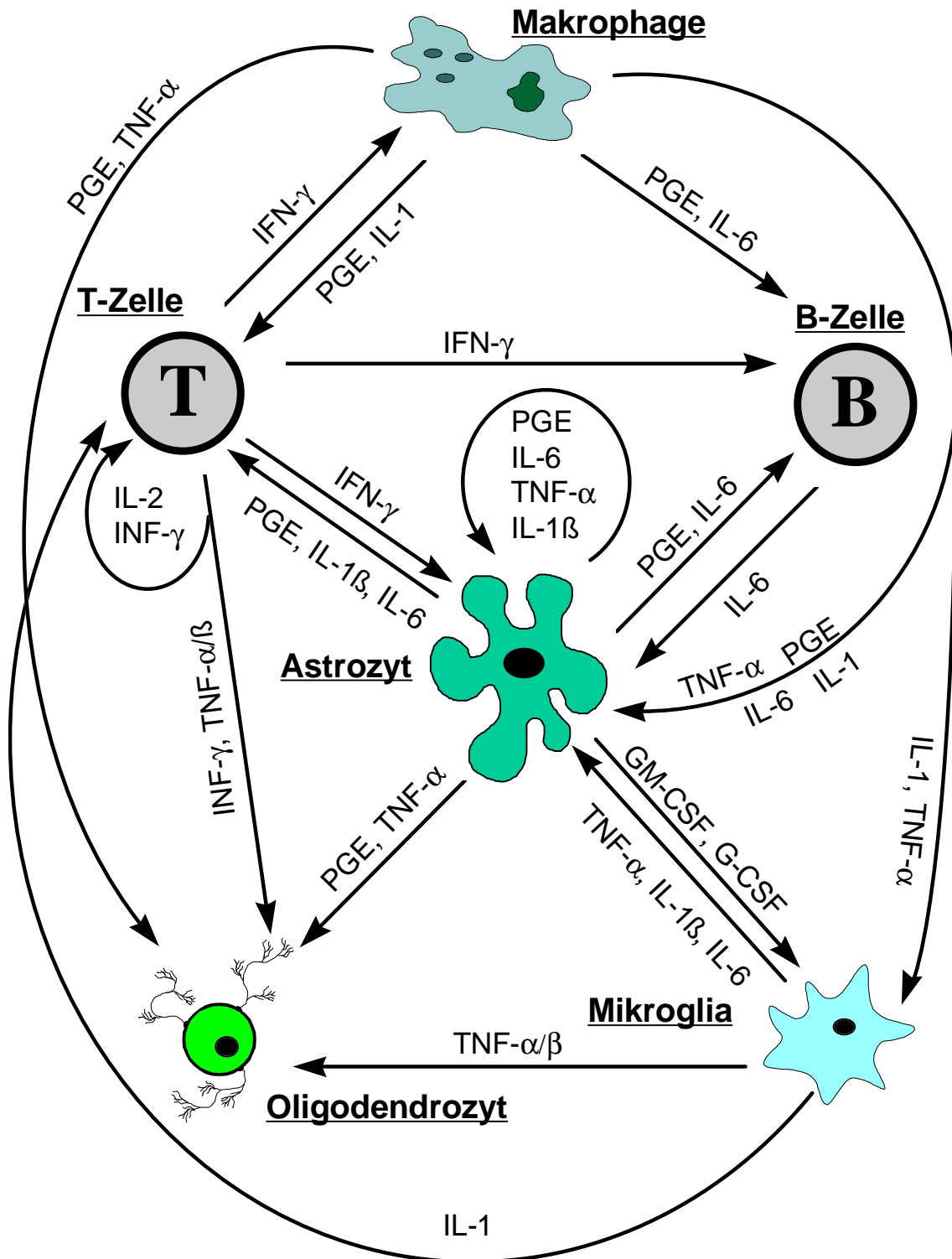


Abb. 2: Interaktionen zwischen Zellen des Immunsystems und des Zentralnervensystem über Zytokine (nach Benveniste et al., 1992)

1.3. Endogene Suppression der Immunantwort

1.3.1. Die HPA-Achse

Mit einer zur Eliminierung eingedrungener Keime beginnenden Immunantwort sind eine Reihe destruktiver Prozesse verbunden. So werden z. B. bei der Aktivierung phagozytierender Zellen durch die Exozytose lysosomaler Enzyme und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies nicht nur der Keim selbst, sondern auch einige gesunde Zellen der Umgebung zerstört.

Um einer wirtsschädigenden Überreaktion des Immunsystems gegenzusteuern, wird von löslichen Immunmediatoren die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse, von engl. hypothalamus-pituitary-adrenal-gland) aktiviert (Abb. 3). Zu Beginn dieser Hormon-Kaskade schüttet der Hypothalamus „Corticotropin freisetzenden Faktor“ (CRF, von engl. corticotropin releasing factor) aus, welcher in der Hypophyse zur Sekretion von „Adrenocorticotropem Hormon“ (ACTH) führt. ACTH selbst veranlaßt die Nebennierenrinde in der Zona fasciculata zur Produktion und Freisetzung von immunsuppressiven Glukokortikoiden. Beim Menschen ist dies hauptsächlich Kortisol, in der Ratte das Homolog Kortikosteron. Da das ZNS diesen Mechanismus auch bei emotionalem Streß wie z.B. Angst in Gang setzt, wird die Reaktionskaskade auch als Streß-Achse bezeichnet. Ist eine Immunantwort Auslöser für die HPA-Achsenaktivierung, so spricht man von inflammatorischem Streß. Als potente HPA-Achsen-Aktivatoren konnten bisher eine Reihe von Zytokinen, wie z.B. IL-1 β (Besedovsky et al., 1986), TNF- α (Turnbull et al., 1997) und IL-6 identifiziert werden (Vallieres et al., 1997).

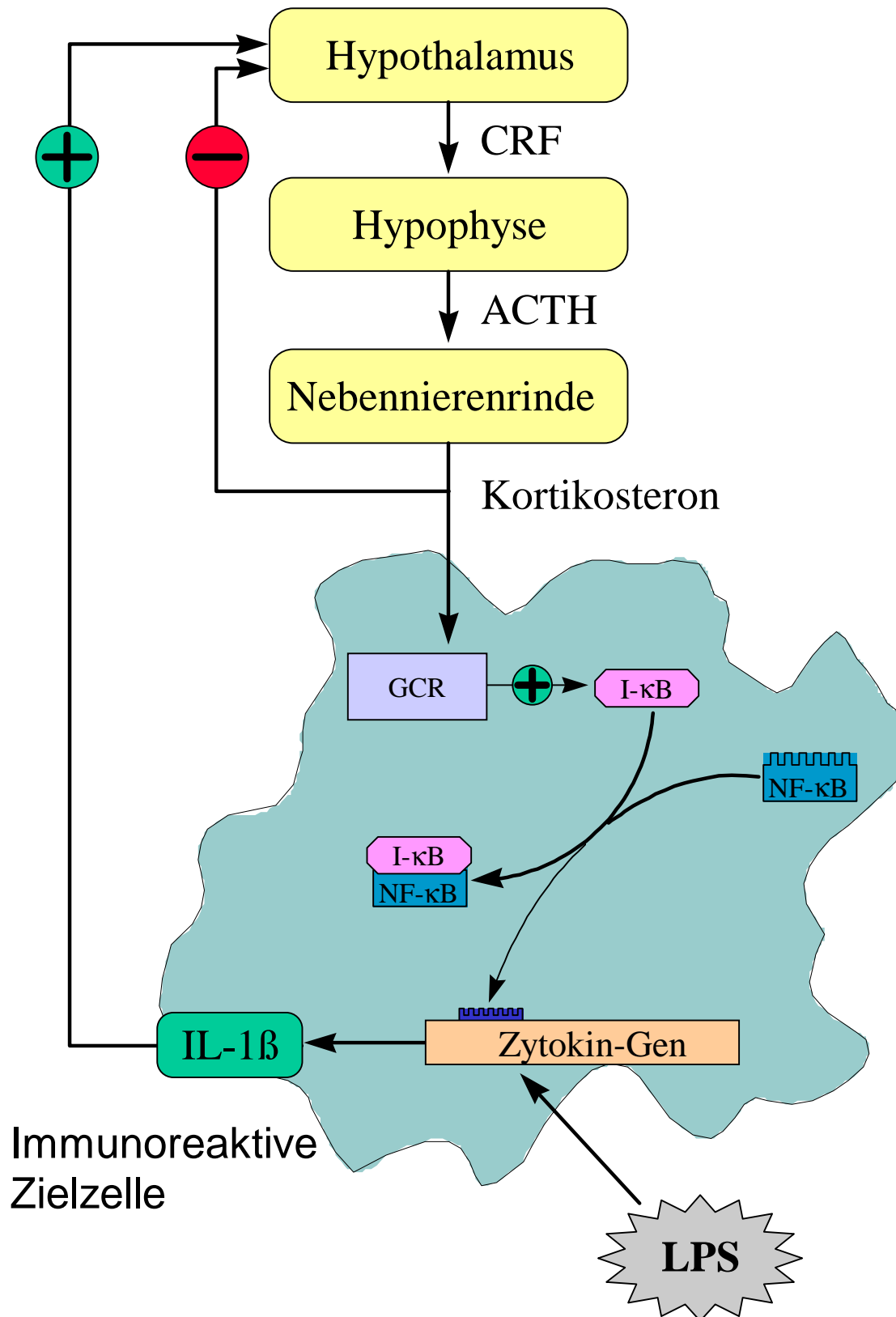


Abb. 3: Hormone der HPA-Achse supprimieren die periphere Zytokinexpression durch Aktivierung des NF-κB-Inhibitors I-κB.

1.3.2. Immunsuppressive Wirkung von Glukokortikoiden

Glukokortikoide gehören zu den stärksten endogenen Immunsuppressiva. Sie inhibieren die Produktion von Zytokinen (Knudsen et al., 1987) und Zelloberflächenmolekülen wie z.B. den LPS-Rezeptor CD14 auf B-Zellen (Nockher und Scherberich, 1997), können in Lymphozyten den programmierten Zelltod, die Apoptose, auslösen (Wyllie, 1980) und supprimieren die Fieberentwicklung durch Inhibition der Prostaglandin-E₂ synthetisierenden Zykllooxygenase-II (Yamagata et al., 1993). Ihr Effektormechanismus beginnt mit der Aufnahme in die Zielzelle und der Bindung an intrazelluläre Rezeptoren vom Typ-I bzw. Typ-II. Der gebildete Glukokortikoid-Rezeptor-Komplex führt zur Inhibition der zur Zytokintranskription notwendigen Transkriptionsfaktoren AP-1 (activating protein-1) (Akerblom et al., 1988; Uht et al., 1997) und NF-κB (nuclear factor kappa B) (Ray et al., 1995). Während der genaue Vorgang der AP-1-Deaktivierung noch nicht geklärt ist, zeichnet sich eine Entschlüsselung der NF-κB-Inhibition ab.

NF-κB liegt als Heterodimer einer p50 und p65 Untereinheit im Zytosol vor. In unstimulierten Zellen verhindert die Bindung von I-κB (inhibitory factor kappa B) an NF-κB die Translokation desselben in den Zellkern und so die Bindung an der Zytokinpromotorregion. Bei Zellstimulation wird durch Phosphorylierung des I-κB eine Abspaltung des I-κB vom NF-κB erreicht, welches nun in den Zellkern gelangt und dort die Zytokintranskription einleitet (Baldwin, 1996) (Abb. 4).

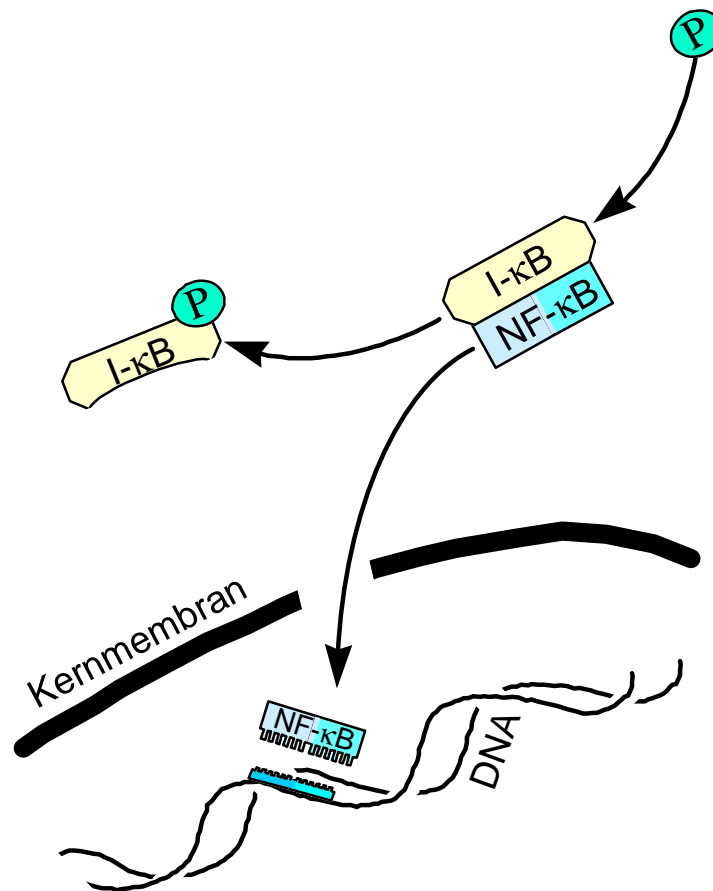


Abb. 4: Inhibition der NF-κB Bindung an den Promotor durch I-κB-Komplexierung und dadurch Verhinderung der NF-κB-Translokation in den Kern. Abspaltung des I-κB vom NF-κB nach Phosphorylierung (P).

NF-κB-Bindungsstellen sind bei einer Reihe von Zytokinen wie z.B. TNF-α bekannt. Auphan et al. (1995) konnten zeigen, daß bei einer Inhibition der Zytokinexpression durch Glukokortikoide die Produktion des NF-κB unbeeinträchtigt bleibt, es jedoch zu einer verstärkten Expression von I-κB-α und somit durch seine Bindung an NF-κB zur Verminderung von freiem, aktiven Transkriptionsfaktor im Zytosol kommt.

1.3.3. Zytokininhibition durch endogene Antagonisten

Für die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β und TNF- α sind bindende Proteine charakterisiert worden, welche als eine Art „Antizytokine“ deren biologische Aktivität inhibieren. In beiden Fällen geht man davon aus, daß proteolytisch abgespaltene, extrazelluläre Teile ihrer transmembranständigen Rezeptoren als Inhibitoren in Frage kommen. Mit der Komplexierung der aktiven Proteine und dem Kappen ihrer spezifischen, signalvermittelnden Rezeptoren stehen zwei verschiedene Mechanismen zur Verfügung, um die physiologischen Folgen der Mediatoren effektiv zu unterbinden. Da sowohl der lösliche Interleukin-1 β -Rezeptor als auch der lösliche TNF- α -Rezeptor kurz nach Beginn einer Infektion, fast zeitgleich mit der Freisetzung von beiden Zytokinen, nachzuweisen sind, ist anzunehmen, daß diese Inhibitoren Bestandteile eines Gegenregulationsmechanismus sind, um ein „Überschießen“ der Immunantwort zu verhindern (Olsson et al., 1993).

1.4. Der Hippokampus

Der Hippokampus („Ammonshorn“) gehört im Zentralnervensystem zu den wichtigsten Strukturen des limbischen Systems, einer Übergangszone zwischen Neokortex und Hirnstamm. Die Annahme, daß diese Region maßgeblich das Verhalten und Empfinden des Menschen beeinflusst, leitet sich aus einer Reihe von Beobachtungen ab, daß Erkrankungen bzw. Verletzungen innerhalb des Hippokampus Verhaltensauffälligkeiten und Wahrnehmungsstörungen zur Folge haben.

Eine Reizung des Mandelkernkomplexes („corpus amygdaloideum“) im Hippokampus löst im Versuchstier Aggressions-, Verteidigungs- und Fluchtreaktionen aus. Eine Entfernung hatte bei Rhesusaffen eine so große Trägheit zur Folge, daß noch nicht einmal lebensbedrohliche Situationen die Fluchtreaktion auslösen konnten. Gleichzeitig stellte sich jedoch ein gesteigerter Sexualtrieb ein (Horel und Misantone, 1974)

Ebenfalls in diesen Strukturen vermutet man die Lokalisation des Langzeitgedächtnis, da die Entfernung des Hippokampus beim Menschen im Rahmen einer Epilepsiebehandlung einen Verlust der Merkfähigkeit, nicht aber des Sekundengedächtnisses zur Folge hat (Milner et al., 1972; Penfield et al., 1968).

Der Hippokampus stellt sich als ein sehr stressempfindliches Areal dar. Veteranen des Vietnamkrieges, welche an PTSD („post traumatic stress disorder“) litten, einer psychischen Erkrankung mit einer Reihe von Wesensveränderungen und Verhaltensauffälligkeiten, zeigten einen signifikanten Schwund des Hippokampusvolumens, der deutlich mit Dauer des Aufenthaltes in Kampfgebieten korrelierte (Gurvits et al., 1996). Ein ähnliches Phänomen konnte Stein bei Frauen aufzeigen, die in ihrer Kindheit sexuell mißbraucht worden waren (Stein et al., 1997). Diese Effekte werden auf die schädigende Langzeiteinwirkung von Glukokortikoiden zurückgeführt. Mehrfach konnte im Tierversuch gezeigt werden, daß chronische Verabreichung von Glukokortikoiden eine Atrophie von Pyramidalneuronen im CA3-Feld des Hippokampus zur Folge hat (Uno et al., 1994; McEwen und Magarinos, 1997). Die Behandlung einer primären Zellkultur hippokampaler Neurone der Ratte mit Glukokortikoiden steigerte deutlich deren Sensibilität gegenüber oxidativen Stress (Behl et al., 1997).

2. Zielsetzung der Arbeit

Es ist noch immer nicht geklärt, welche Rolle das Zentralnervensystem bei einer peripheren immunologischen Reaktion spielt und ob die periphere Immunantwort das Verhalten und Empfinden maßgeblich beeinflusst. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten am Modell der Ratte nach Simulation einer peripheren Entzündung pro- und antiinflammatorische Prozesse im Zentralnervensystem im Bereich des Hippokampus untersucht werden. Proinflammatorische Zytokine wurden sowohl in der Peripherie als auch im Hippokampus auf mRNA- und Proteinebene bestimmt, um Informationen zu erhalten, ob Zellen des Zentralnervensystems mit in die Immunreaktion einbezogen werden. Weiterhin sollten Analysen von Hormonen und Rezeptoren der Stressachse Auskunft darüber geben, in welchem Ausmaß endogene, immunsuppressive Effekte den proinflammatorischen Komponenten entgegensteuern. Um die Frage zu klären, ob die beobachteten Effekte allein auf eine aktivierte HPA-Achse und nicht auf die Einflußnahme LPS-induzierter inflammatorischer Mediatoren zurückzuführen sind, wurde zum Vergleich die Immobilisation als psychischer Stressor eingesetzt.

3. Material und Methoden

3.1. Tierexperimente

3.1.1. Tiere und Tierhaltung

Männliche Lewis-Ratten (200-250 g) wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchern) bezogen. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% in einem 12:12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus (hell von 7 - 19 Uhr) gehalten. Futter und Wasser waren ad libitum.

3.1.2. Adaptation der Tiere

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere einer 2-wöchigen Adaptation (engl. Handling) unterzogen. Durch Beschäftigung mit den Tieren und regelmäßiges Umsetzen in neue Käfige konnten sich die Ratten an die Umgebung gewöhnen.

3.1.3. Lipopolysaccharid (LPS)-Applikation

Um einen Endotoxin-vermittelten Entzündungsstreß zu induzieren, wurde den Tieren der entsprechenden Untersuchungsgruppe Lipopolysaccharid, ein Zellmembranbestandteil gramnegativer Bakterien, in einer Dosis von 10 µg/kg intraperitoneal injiziert. Das verwendete LPS (Sigma, Deisenhofen) von *Escherichia coli*, Stamm 0127:B8 wurde in physiologischer Kochsalzlösung als Applikationsmedium verabreicht. Kontrolltiere erhielten das Lösungsmittel allein.

3.1.4. Immobilisationsversuche

Zur Immobilisation wurde je ein Tier in eine 12 cm lange Plexiglasröhre ($\varnothing=6\text{cm}$) (Abbildung 5) gesetzt. Durch eine bewegliche Frontscheibe wurde der Bewegungsfreiraum 10 min lang auf ein Minimum reduziert. Nach der Immobilisation wurden die Tiere sofort bzw. nach der im Ergebnisteil angegebenen Erholungszeit durch Dekapitation getötet.



Abb.: 5 In der Immobilisationsröhre wurde durch Einschränkung des Bewegungsfreiraumes psychischer Streß ausgelöst.

3.1.5. Messung der Körpertemperatur

Um nach LPS-Applikation am wachen, sich frei bewegenden Tier nichtinvasiv die Körpertemperatur bestimmen zu können, wurde 14 Tage vor Versuchsbeginn unter Chloralhydratnarkose (400 mg/kg i.p.) ein 1,4 x 0,6 cm großer Sender (Minimitter[®], Minimitter[®]-Company, USA) (Abb.: 6) intraperitoneal implantiert. Dieser Sender funkt breitbandig auf Mittelwelle Impulse, deren Pausenlänge proportional zur Körpertemperatur ist. Die Funksignale wurden mit einem Transistorradio empfangen, dessen Frequenz so eingestellt war, daß sich eine maximale Signalstärke ergab. Über den

Anschluß für einen externen Lautsprecher wurde das Audio-Signal an einen x-t-Schreiber weitergeleitet und dort aufgezeichnet. Zur Auswertung wurden die empfangenen Signalspitzen pro Minute ausgezählt und anhand einer für jeden Minimitter[®] vorher angefertigten Kalibrationskurve in die Körpertemperatur umgerechnet (Abbildung 7).

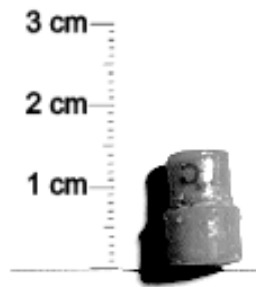


Abb.: 6 Der Temperatursensor Minimitter[®] im Größenvergleich

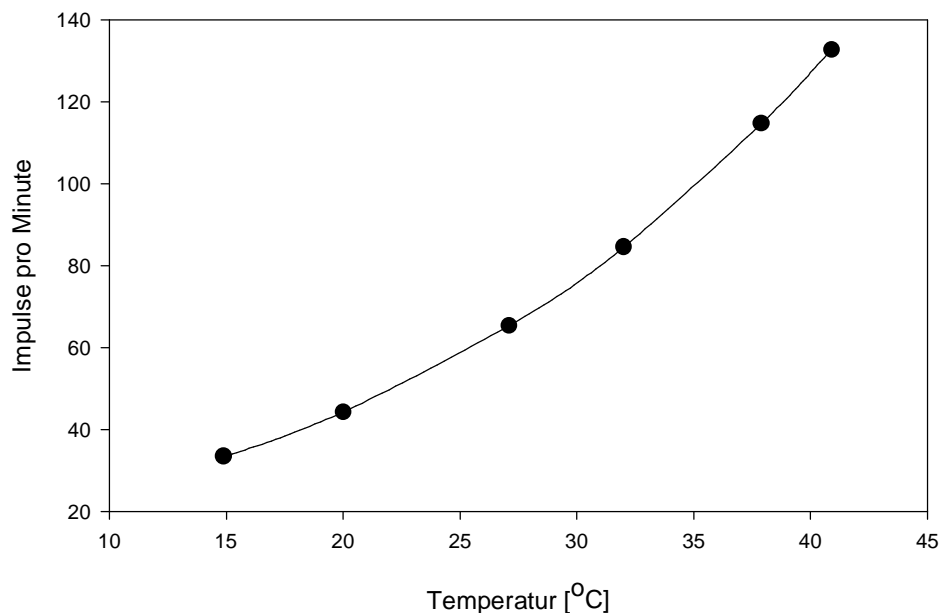


Abb.: 7 Kalibrationskurve eines Minimitter[®] für verschiedene Temperaturen

3.1.6. Probenentnahme

Nach Versuchsende wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Zur Serumgewinnung aus dem Vollblut wurden ca. 3 ml Blut in einem Polystyrolröhrchen aufgefangen und 1 h bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde bei 4 °C und 1200 x g 30 min zentrifugiert, der klare Serumüberstand abgenommen und bei -80 °C zu weiteren Verwendung eingefroren. Das übrige Blut wurde in einem heparinisierten 50 ml-Falcon-Röhrchen aufgefangen. 50 µl des heparinisierten Blutes wurden für die spätere mRNA-Gewinnung sofort in 400 µl Extraktionspuffer (Pharmacia, Freiburg) überführt, vermischt und eingefroren.

Die Milz wurde entfernt und gewogen. Etwa die Hälfte der Milz wurde bis zur anschließenden Lymphozytenpräparation auf Eis gelagert und der Rest bei -80 °C in toto eingefroren. Nach Öffnung des Schädels wurde das Gehirn entnommen, das Areal des Hippokampus herauspräpariert, in flüssigem Stickstoff gefrostet und bei -80 °C eingelagert.

3.2. Serologische Untersuchungen

3.2.1. Messung der Leukozytenkonzentration im peripheren Vollblut

Die Bestimmung der Leukozytenkonzentration im peripheren Vollblut erfolgte mit Hilfe eines auf der Methodik der Durchflußzytometrie basierenden Zellzählers Sysmex F-800 (Toa Medical, Kobe, Japan). Der Messvorgang wurde für jede Probe dreimal durchgeführt. Anschließend wurden die Einzelergebnisse gemittelt.

3.2.2. Proteinisolierung aus hippokampalem Gewebe

Zur Untersuchung der Expression proinflammatorischer Zytokine auf Proteinebene wurde aus dem Gewebe des Hippokampus ein Proteinextrakt gewonnen. Dazu wurde das isolierte Areal bei 0 °C mit 2 ml eines Tris-Triton-

Extraktionspuffers (63 mM Tris-HCl, 10% Glycerin, 2% Triton X-100, 1 mM DTT, 1mM EDTA, 0,5 mM PMSF, modifiziert nach Mink und Johnston, 1996) homogenisiert. Anschließend wurden die Zellfragmente 10 min bei 4 °C und 18000 x g abzentrifugiert, und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.2.3. Nachweis proinflammatorischer Zytokine

Zum Nachweis der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- α wurden kommerzielle, hoch-sensitive ELISA-Systeme der Firma Biosource (Camarillo, USA) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um Sandwich-ELISAs, bei denen die Probe zunächst an einen mit der Mikrotiterplatte verbundenen Erstantikörper (Fangantikörper) bindet. Nach Inkubation mit einem Biotin gekoppelten Zweitantikörper wird an diesen ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex gebunden. Die quantitative Umsetzung eines zugegebenen Chromogens wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm im Mikrotiterplattenphotometer MR7000 (Dynatec, Denkendorf) gemessen. Die Umrechnung der Extinktionswerte in Konzentrationen erfolgte über eine pro Ansatz mitgeführte Kalibrationsreihe abgestufter Standardverdünnungen des jeweilig zu bestimmenden Zytokins.

3.2.4. Bestimmung des Serum-Kortikosterons

Die Bestimmung des Serum-Kortikosterons erfolgte auf Basis eines Iod¹²⁵-Radio-Immunsorbent-Assays (RIA) mit Hilfe des kommerziellen Testsystems (ICN, Costa Mesa, USA). Hierbei handelt es sich um kompetitives Nachweisverfahren. Der Serumprobe zugesetztes Iod¹²⁵-markiertes Kortikosteron konkurriert mit dem im Serum vorliegendem nativen Kortikosteron um die Bindung am zugefügten Kortikosteron-spezifischen Antikörper. Der gebildete Kortikosteron-Antikörper-Komplex wird mit Hilfe einer Dextranlösung bei anschließender Zentrifugation sedimentiert und der dekantierte Überstand im Gamma-Zähler vermessen. Die Anzahl der pro

Minute ermittelten Zerfallsereignisse (counts per minute, cpm) verhält sich umgekehrt proportional zu der vorliegenden Serum-Kortikosteron-Konzentration.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. mRNA-Präparation

Zur Präparation der mRNA aus peripheren Blutleukozyten bzw. hippokampalen Gewebe wurde das kommerzielle System QuickPrep[®] (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) eingesetzt. Hierfür wurde zunächst ein Zellysat des Probenmaterials im mitgelieferten Extraktionspuffer hergestellt. Während bei der Blutentnahme das Vollblut gleich in den vorgelegten Extraktionspuffer überführt wurde und hierbei sofort die Zellyse erfolgte, mußte das abgewogene Hirngewebe mit dem entsprechenden Gewichtsäquivalent an Extraktionspuffer im Glas-Homogenisator homogenisiert werden. Die sich anschließenden Arbeitsprozesse der mRNA-Isolation und Reinigung von DNA und Protein waren für Leukozyten- und Hirnhomogenat gleich. Nach der Inkubation des Zellysates mit oligo-dT-Zellulose und anschließender Zentrifugation befand sich die in der Probe befindliche mRNA im Sediment an der Zellulose gebunden, der Protein und DNA enthaltene Überstand wurde verworfen. Wiederholtes Resuspendieren der Zellulose in Waschpuffern und Anzentrifugieren entfernte noch anhaftende Proteinreste. Im Eluationsschritt wurde die Zellulosesuspension in eine Minisäule überführt, durch Zentrifugation Waschpufferreste entfernt und schließlich durch Zugabe von 65 °C warmem Eluationspuffer die an der oligo-dT-Zellulose haftende mRNA heruntergewaschen. Der hieraus erhaltenen 400 µl mRNA-Lösung wurden neben Glykogen-(10 µl; 5mg/ml) und Natriumacetatlösung (40 µl; 2,5M) -20 °C kaltes Ethanol (95 %) zugesetzt und der Ansatz bei -20 °C über Nacht zur Ausfällung der mRNA stehen gelassen. Nach Abzentrifugation der präzipitierten mRNA bei 4 °C und 12.000 x g wurde diese in 500 µl Ethanol(-20 °C , 70%) aufgenommen, erneut durch Zentrifugation pelletiert und im Ölpumpenvakuum ca. 10 min von Wasser und

Ethanolresten befreit. Die als trockenes Plättchen verbliebene mRNA wurde in 50 µl DEPC behandelten Wasser aufgenommen und 1 h auf Eis quellen gelassen.

3.3.2. cDNA-Synthese

Da in der Polymerasen-Kettenreaktion die Taq-Polymerase nur DNA-Matrizen erkennt, mußte die isolierte mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, welche zudem noch wesentlich stabiler und somit besser zu handhaben ist. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe und Vorschrift des kommerziellen cDNA-Synthese-Kits der Firma Gibco BRL (Gaithersburg, USA) unter Verwendung der darin enthaltenen SuperScript-II Reverse Transkriptase. Im ersten Schritt wurde durch Inkubation der mRNA mit oligo-dT₁₅-Primern, welche an die poly-A-Stränge der mRNA binden, die doppelsträngige Ansatzstelle für die Reverse Transkriptase geschaffen. Dieses Enzym setzte in der anschließenden Inkubationsphase die zugegebenen Desoxy-Nukleotide zu einem der mRNA komplementären DNA-Strang zusammen. Die so synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.3. Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Die zur Visualisierung vorliegender cDNA notwendige spezifische Amplifikation erfolgte nach dem Prinzip der Polymerasen-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) (Mullis, 1990). Die für das jeweilige Transkript notwendigen Primer wurden auf Grundlage der publizierten mRNA-Sequenzen in der EMBL-Datenbank (EMBL, Heidelberg) herausgesucht und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die vollständige Liste der verwendeten Primer findet sich im Anschluß an den Material- und Methoden-Teil. Im Negativkontrollansatz, welcher als Kontrolle für Verunreinigungen der verwendeten Reagenzien und unspezifische Banden durch Primer-Wechselwirkungen fungiert, wurden alle Reaktionskomponenten ohne cDNA-Matrize eingesetzt. In diesem Ansatz durften nach der PCR keine

Produkte sichtbar sein. In der Positivkontrolle wurde eine Referenzprobe eingesetzt, welche die Zielmatrize enthielt, um bei einem Negativergebnis der unbekannten Proben sichergehen zu können, daß die PCR störungsfrei abgelaufen ist.

3.3.3.1. Reaktionsansatz

Ein 50 µl -Reaktionsansatz in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl cDNA-Lösung

5 µl Taq-Reaktionspuffer, 10x (Pharmacia Biotech)

1 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10mM)

1 µl 5'-Primer (50pmol/µl)

1 µl 3'-Primer (50pmol/µl)

0,2 µl Taq-Polymerase (Pharmacia Biotech)

40,8 µl Wasser

Im Thermocycler (Hybaid, England) lief die Amplifikationsreaktion dann unter folgendem Temperaturprofil:

Reaktionsssschritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung:	1 min	94 °C
Primerbindung:	1 min	Primer-spezifische Bindungstemperatur (Annealingtemperatur) siehe Aufstellung der verwendeten Primer
Elongation:	1 min	72 °C

bei 25 - 43 Zyklen ab. Die letzte Elongation wurde auf 5 min verlängert, um der Polymerase das Komplettieren verbliebender Einzelstränge zu ermöglichen.

3.3.3.2. Visualisierung der Reaktionsprodukte

10 µl des PCR-Reaktionsansatzes wurden zur Auftrennung der PCR-Produkte (Amplikons) mit 2 µl Auftragspuffer vermischt in einem submarinen 1,5 % Agarosegel (UltraPure, Sigma) unter TAE-Puffer bei 4 V pro cm Gellänge aufgetrennt und im Ethidiumbromidbad angefärbt. Um die Größe der aufgetrennten PCR-Produkte ermitteln zu können, wurde parallel ein 100-Basenpaarmarker (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Zur weiteren Dokumentation und quantitativen Auswertung diente das Imaging-System „BioProfil[®]“ (VILBERT LOURMANT, Marne La Vallee, Frankreich).

Dazu wurde auf einem UV-Licht-Transilluminator ($\lambda=312\text{nm}$) mit Hilfe einer CCD-Kamera das gefärbte Gel photographisch erfaßt und das digitalisierte Bild im Personal-Computer zur späteren Auswertung abgespeichert. Die Software BIO1D[®] (VILBERT LOURMANT, Marne La Vallee, Frankreich) ermöglichte die Umrechnung der Bandenintensität in optische Dichte (Volumes) (Abbildung 8).

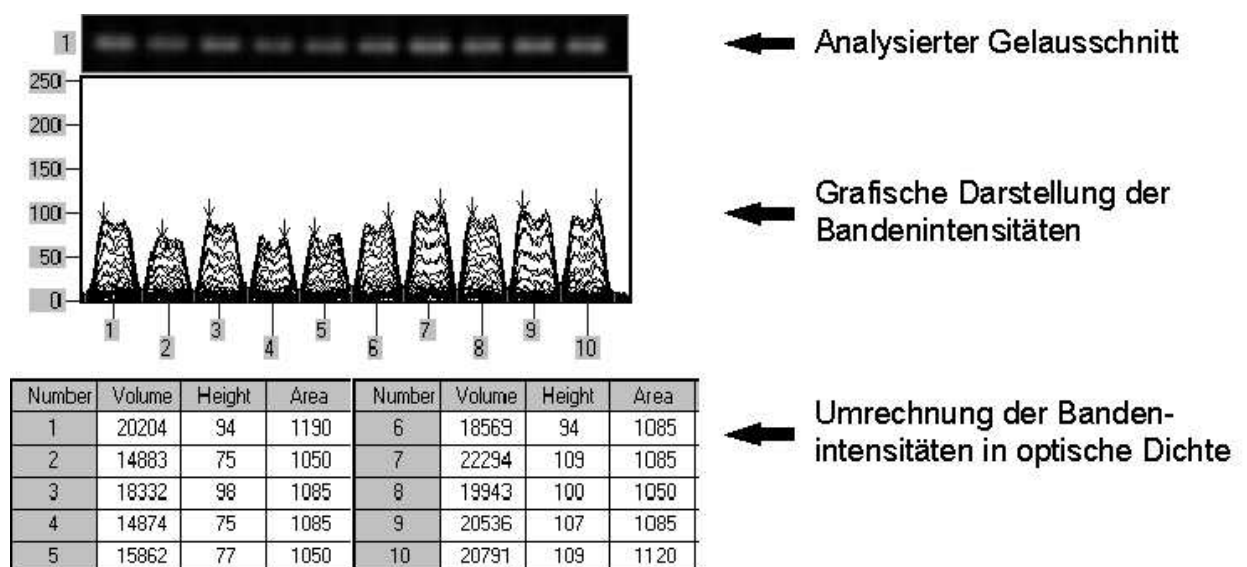


Abb.: 8 Optische Bandendichten eines Gelabschnittes

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der PCR in der Weise dargestellt, daß im Streifen des Agarosegelphotos hintereinander die 5 Proben der Kontrollgruppe, die 5 Proben der behandelten Gruppe, die Negativkontrolle (-) und schließlich die Positivkontrolle (+) plaziert sind. Die Mittelwerte der optischen Dichten beider Gruppen sind als Balkendiagramm darüber abgebildet (Abb.: 9).

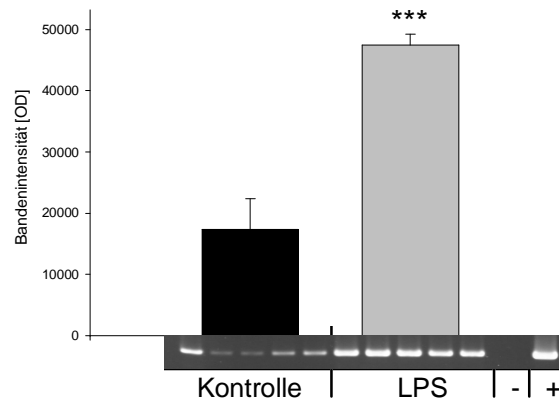


Abb.: 9 Beispiel für die Darstellung eines PCR-Resultates. Jede PCR wurde mit N=5 pro Gruppe durchgeführt, die optischen Dichten sind als Mittelwerte \pm SEM graphisch abgebildet.

3.3.4. Quantitative PCR

Um von Bandenintensitäten aufgetrennter PCR-Produkte Aussagen hinsichtlich einer Regulation machen zu können, muß gewährleistet sein, daß sämtliche, später zu vergleichende Proben bei der mRNA-Präparation gleiche Mengen Zellmaterial enthielten bzw. vergleichbar aufgearbeitet wurden. Da ein Abgleich der Proben über ihren mRNA-Gehalt bei der oben beschriebenen Präparationsmethode aufgrund zu geringer Mengen nicht möglich war und ein Angleichen spezifisch erhöhter mRNA-Mengen an die Kontrollen expressionsbedingte Unterschiede nicht mehr darstellt, muß ein interner Standard herangezogen werden. Als interne Standards dienen Gene, welche nach dem jetzigen Stand der Wissenschaft keiner transkriptionellen Regulation unterliegen, d.h. selbst im Fall einer starken Zellaktivierung nicht oder nur unwesentlich verändert exprimiert werden (konstitutive Expression).

Nachdem erste Versuche auf eine Regulation des bisher als konstitutiv exprimiert betrachteten Gens β -Aktin im Gehirn hinwiesen, wurde Glycerinaldehyddehydrogenase (GAPDH) als interner Standard verwendet.

Da die Bandenintensität und damit die optische Dichte nicht direkt proportional zur Menge des aufgetrennten PCR-Produktes ist, empfiehlt sich im Rahmen einer Quantifizierung der vorliegenden GAPDH-Transkripte der Einsatz eines zugefügten Standards bekannter Konzentrationen. Bei dem Standard handelt es sich um ein artifizielles oligo-Nukleotid, welches die gleiche Primerbindungsstellen wie das zu quantifizierende Transkript aufweist, jedoch 50 bis 100 Basenpaare kürzer ist und als Kompetitor bezeichnet wird, da es mit der nativen cDNA-Matrize um das Polymeraseenzym konkurriert. Das in dieser Arbeit eingesetzte Kompetitorfragment für GAPDH ist 139 Basenpaare lang und wurde freundlicherweise von T. Köhler, Institut für physiologische Chemie, Leipzig überlassen.

Wird die im PCR-Ansatz vorliegende native cDNA mit dem artifiziiellen Standard aufgestockt, elongiert die Taq-Polymerase in der Amplifikationsreaktion beide Matrizen parallel. Im Gel der aufgetrennten Amplikons sind daher 2 Banden sichtbar (Abb.: 10).

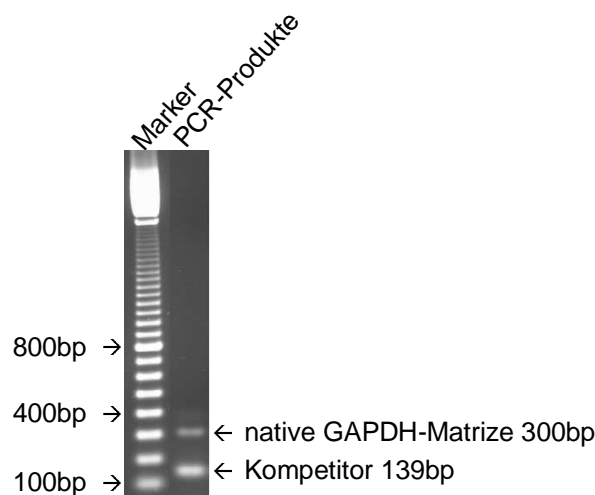


Abb.: 10 PCR einer nativen GAPDH-Matrize mit Kompetitor ergibt zwei PCR-Produkte

Werden in mehreren PCR-Ansätzen eine Verdünnungsreihe des Kompetitors eingesetzt, wird mit abfallenden Konzentrationen weniger Kompetitor amplifiziert und mehr native cDNA-Matrize (Abb.: 11).

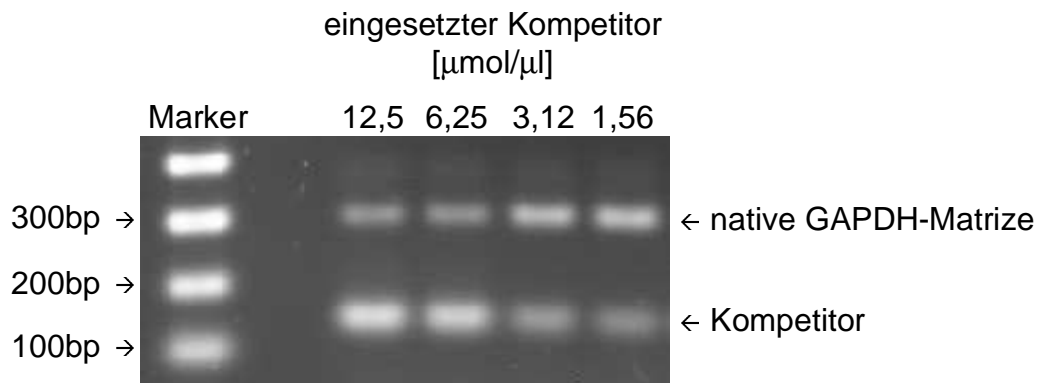


Abb.: 11 PCR einer mit verschiedenen Kompetitormengen aufgestockten nativen GAPDH-Matrize

Trägt man die optischen Dichten der nativen Matrize gegen die Kompetitor-konzentration auf, schneiden sich die Geraden der beiden Amplikons (Abb.: 12)

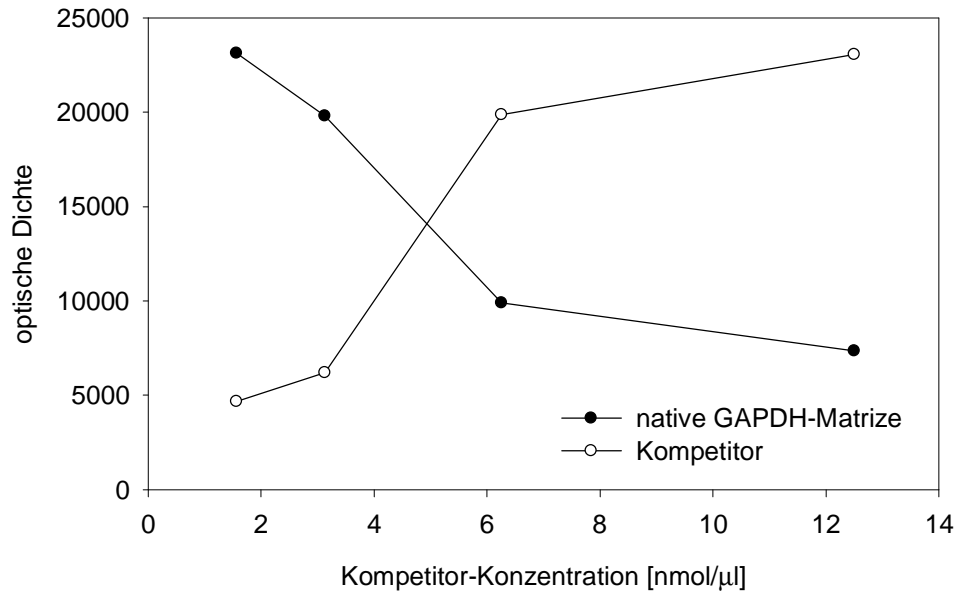


Abb.: 12 Optische Dichten der Amplikons einer kompetitiven PCR

An dieser Stelle theoretisch gleicher optischer Bandendichte sind die Konzentrationen von nativer Matrize und Kompetitor gleich. Rechnerisch läßt sich dieser Punkt ermitteln, indem der Logarithmus des Quotienten $OD_{\text{Probe}}/OD_{\text{Kompetitor}}$ gegen den Logarithmus der Kompetitor-Konzentration aufgetragen wird. Für den theoretischen Fall, daß beide optischen Dichten gleich sind, ergibt sich $\text{LOG}(OD_{\text{Probe}}/OD_{\text{Kompetitor}}) = 0$.

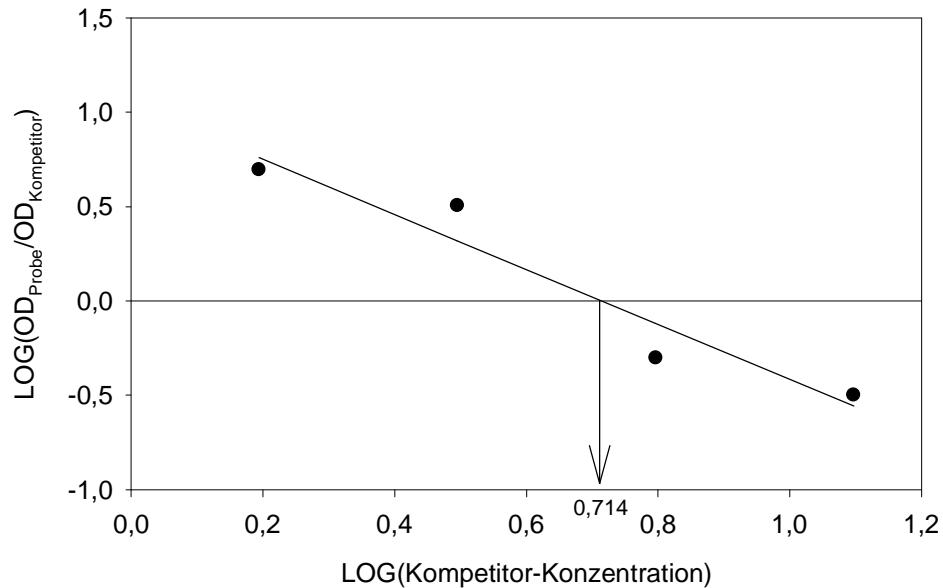


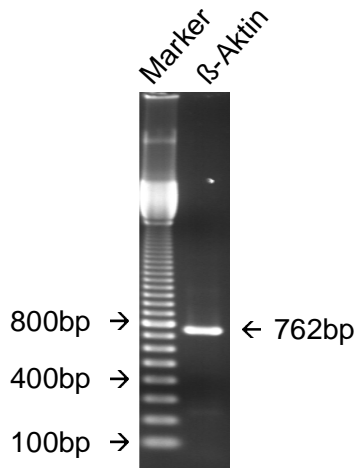
Abb.: 13 Rechnerische Ermittlung der nativ-Matrizen-Konzentration

Wird nun der Wert an der Stelle, wo die Ausgleichsgerade die X-Achse schneidet, ermittelt und entlogarithmiert, erhält man die Konzentration der eingesetzten nativen cDNA-Matrize. Im hier beschriebenen Fall $10^{0,714} = 5,181$ nmol/ μl (Abb. 13).

Die nach dieser Methode ermittelten GPADH-mRNA-Konzentrationen können dann durch Verdünnung an die geringst konzentrierten Probe angeglichen werden.

3.3.4.1. Aufstellung der eingesetzten Primer

3.3.4.1.1. Primer der „housekeeping“-Gene



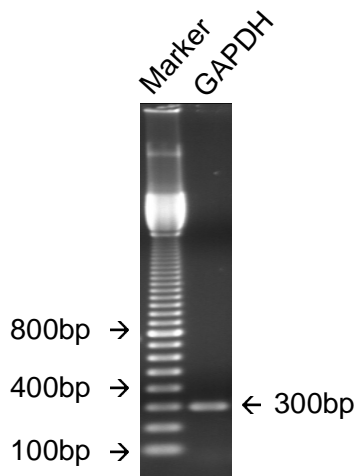
β-Aktin

sense Primer: CTA TCG GCA ATG AGC GGT TC

antisense Primer: CTT AGG AGT TGG GGG TGG CT

Annealingtemperatur: 65 °C

PCR-Produktlänge: 762 Basenpaare



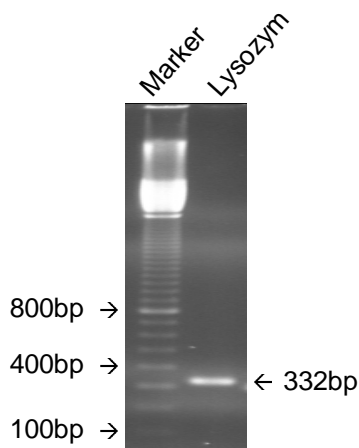
GAPDH

sense Primer: CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA

antisense Primer: CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT

Annealingtemperatur: 62 °C

PCR-Produktlänge: 300 Basenpaare



Lysozym

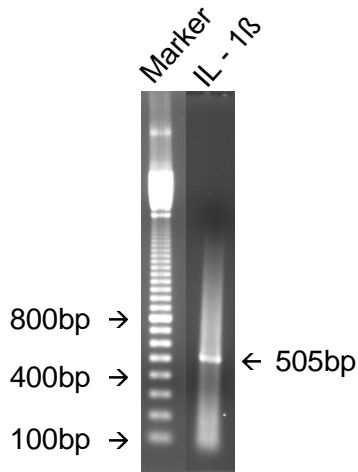
sense Primer: AAG GCA TTC GAG CAT GGG TG

antisense Primer: TGT TTG TAT CCG GCA CAG GG

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 332 Basenpaare

3.3.4.1.2. Zytokin-Primer



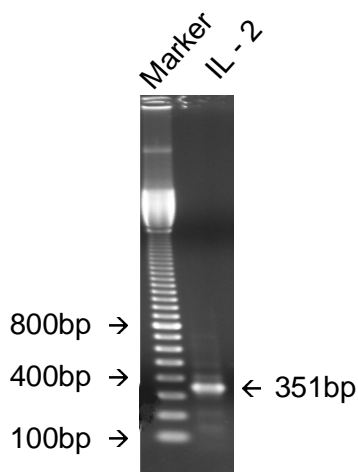
Interleukin-1 β

sense Primer: GCC CGT CCT CTG TGA CTC GT

antisense Primer: GGA AGA CAC GGG TTC CAT GG

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 505 Basenpaare



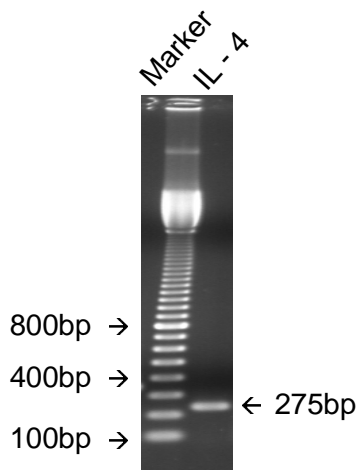
Interleukin-2

sense Primer: GCG CAC CCA CTT CAA GCC CT

antisense Primer: CCA CCA CAG TTG CTG GCT CA

Annealingtemperatur: 62 °C

PCR-Produktlänge: 351 Basenpaare



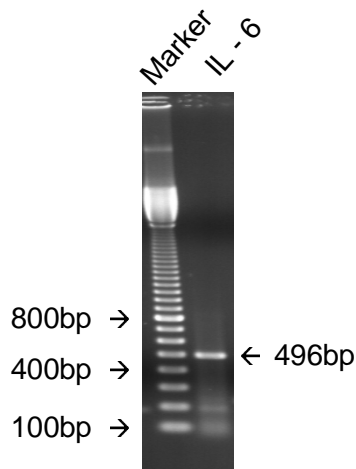
Interleukin-4

sense Primer: ATG CAC CGA GAT GTT TGT ACC

antisense Primer: TTT CAG TGT TGT GAG CGT GGA

Annealingtemperatur: 62 °C

PCR-Produktlänge: 275 Basenpaare



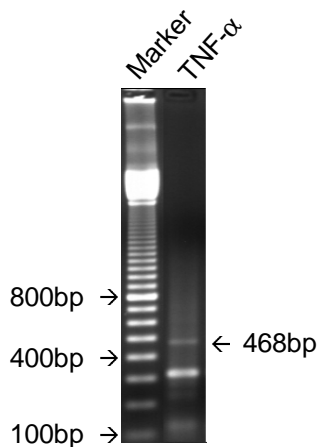
Interleukin-6

sense Primer: CCA CCT CAC AAG TCG GAG GC

antisense Primer: CTA GGT TTG CCG AGT AGA CC

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 496 Basenpaare



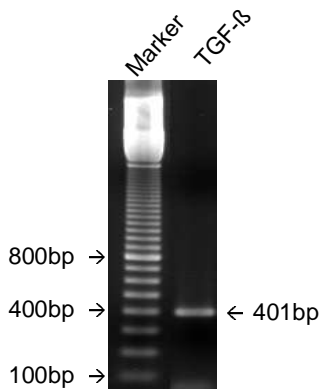
Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

sense Primer: CGA GTG ACA AGC CCG TAG CC

antisense Primer: GGA TGA ACA CGC CAG TCG CC

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 468 Basenpaare



Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β)

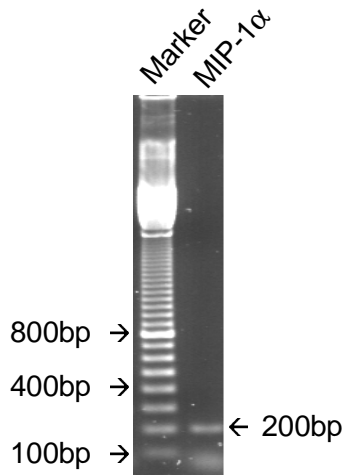
sense Primer: GGA GCT GGT GAA ACG GAA GC

antisense Primer: GGT AGA GTT CTA AGT GTT GC

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 401 Basenpaare

3.3.4.1.3. Chemokin-Primer



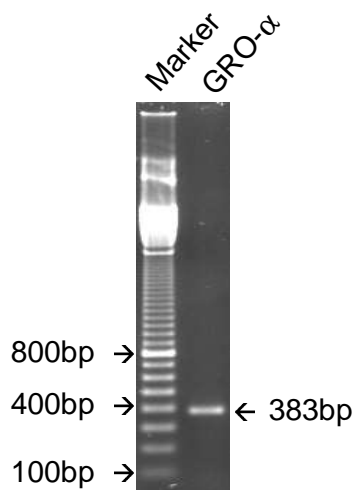
MIP-1 α

sense Primer: CAC CAC TGC CCT TGC TGT TC

antisense Primer: GCC GGT TTC TCT TGG TCA GG

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 200 Basenpaare



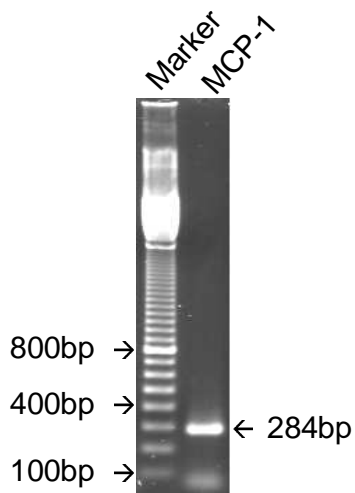
GRO- α

sense Primer: GGC TTG CCT TGA CCC TGA AG

antisense Primer: CCT TCT TCC CGC TCA ACA CC

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 383 Basenpaare



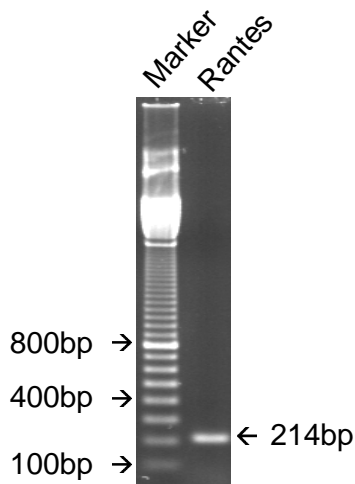
MCP-1

sense Primer: CAA TGA GTC GGC TGG AGA AC

antisense Primer: AGT GCT TGA GGT GGT TGT GG

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 284 Basenpaare



RANTES

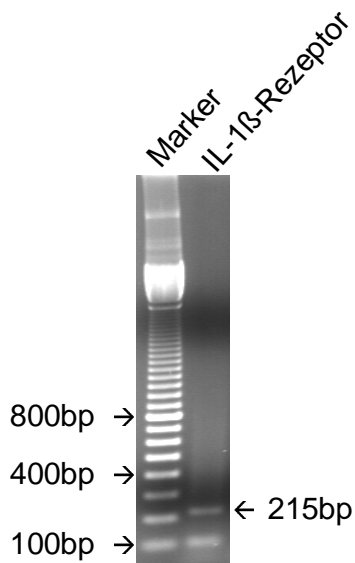
sense Primer: TGC ATC CCT CAC CGT CAT CC

antisense Primer: TGG GTT GGC ACA CAC TTG GC

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 214 Basenpaare

3.3.4.1.4. Zytokin-Rezeptor-Primer



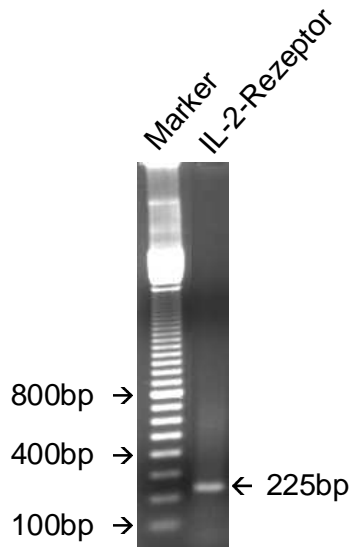
Interleukin-1β-Rezeptor

sense Primer: TGG AGA CCG ACA AAT GCA CG

antisense Primer: CAT CTT GGC GGG AAC AAA CC

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 215 Basenpaare



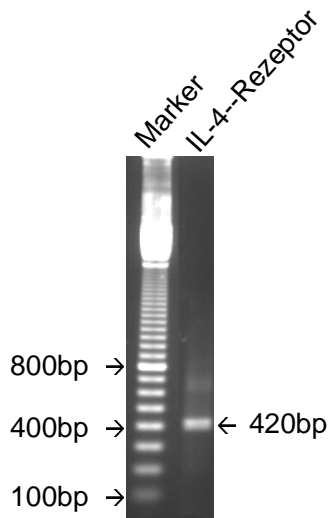
Interleukin-2-Rezeptor

sense Primer: CCA ATG CCA CGT TCA AAG CC

antisense Primer: ATT TCT GCG TGT CCG TGG TC

Annealingtemperatur: 62 °C

PCR-Produktlänge: 225 Basenpaare



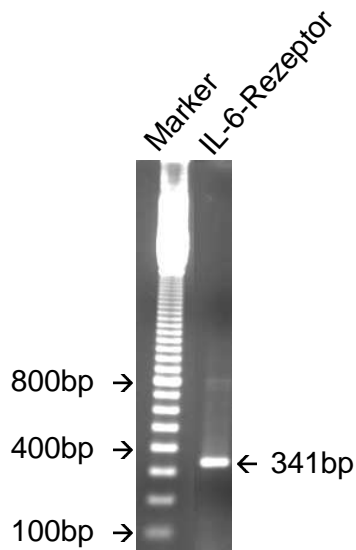
Interleukin-4-Rezeptor

sense Primer: GGC TTT GCA CCA AGT TCC TG

antisense Primer: ACA TCA GCA GCA GGC CAT TG

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 420 Basenpaare



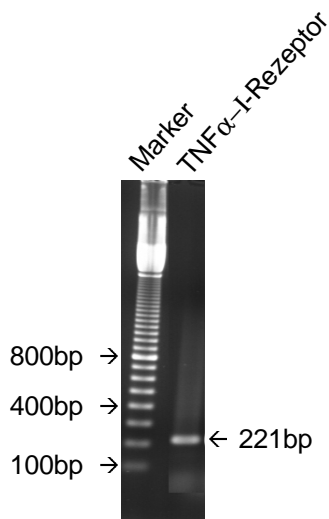
Interleukin-6-Rezeptor

sense Primer: GTG CGT TGC AAA CAG TGT CG

antisense Primer: ATT TGC TCC ACT GGC CAA TG

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 341 Basenpaare



TNF α -I-Rezeptor

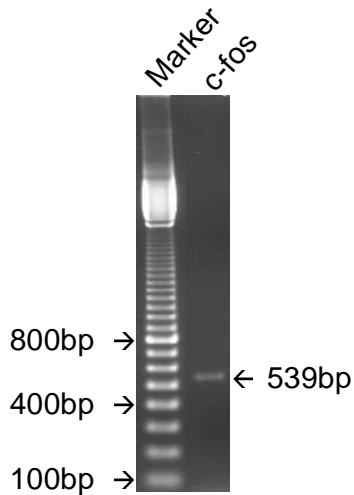
sense Primer: TGC GAT GCT GTA TGC TGT GG

antisense Primer: GGT TCA TGT CGC AAA GCA CG

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 221 Basenpaare

3.3.4.1.5. Primer der Transkriptionsfaktoren



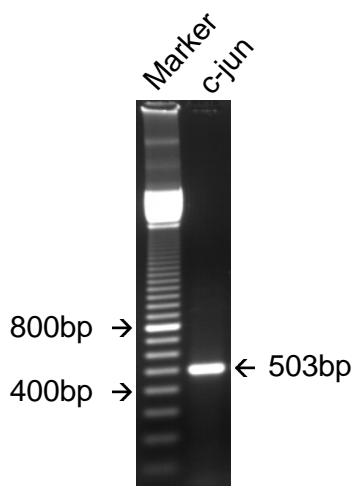
c-fos

sense Primer: TTT CAA CGC GGA CTA CGA GG

antisense Primer: TGG CAA TCT CGG TCT GCA AC

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 539 Basenpaare



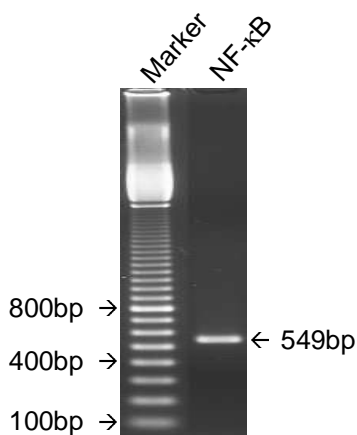
c-jun

sense Primer: CTT CTA CGA CGA TGC CCT CAA

antisense Primer: AGT TGC TGA GGT TGG CGT AGA

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 503 Basenpaare



NF-κB

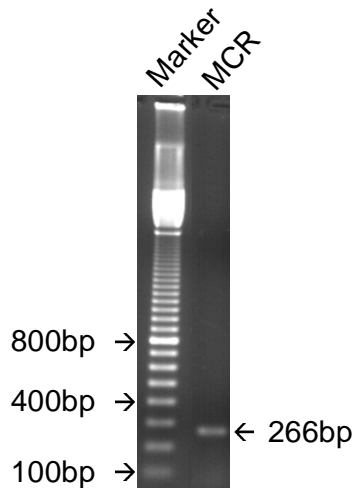
sense Primer: TGG CAT CTT CTC CTT CCA GC

antisense Primer: TGG CAT CTT CTC CTT CCA GC

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 549 Basenpaare

3.3.4.1.6. Übrige Primer



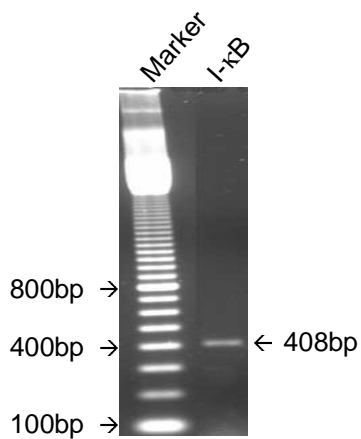
Mineralcorticoid-Rezeptor (MCR)

sense Primer: TCC ATT ACG CAT GCA CTC
ACA C

antisense Primer: CTC CAA CTC AAA GCG AAC
GAT G

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 266 Basenpaare



I-κB

sense Primer: CGT TCC TGC ACT TGG CAA TC

antisense Primer: TGA GCG TTG ACA TCA GCA CC

Annealingtemperatur: 58 °C

PCR-Produktlänge: 408 Basenpaare

3.4. Immunohistochemische Identifizierung von Leukozyten im hippocampalen Gewebe

Um im Gewebe des Hippokampus eingewanderte Monozyten bzw. Makrophagen und T-Zellen nachweisen zu können, wurde auf Gefrierschnitten die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode eingesetzt. Die Reagenzien hierfür stammten aus dem Vectastain Mouse IgG ABC-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA), die mitgelieferte Vorschrift wurde leicht modifiziert.

Trockene Gefrierschnitte der Schichtdicke 7µm wurden für 10 min bei 4 °C mit Isopropanol (96%) fixiert und dann mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 30 µl des Erstantikörpers (1:300 verdünnt in PBS; 1% BSA; 0,1% Natriumazid; $3,3 \times 10^{-4}$ % Avidin) aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Als Erstantikörper wurde für die spezifische Monozyten/Makrophagen-Färbung ED1 (anti-CD68) eingesetzt und die T-Zellen mit R73 (anti- α/β -T-Zell-Rezeptor) markiert (beide von Serotec, Oxford, England). Nachdem ungebundener Antikörper mit PBS abgewaschen worden war, wurde der Schnitt 30 min bei Raumtemperatur mit 30 µl des Zweitantikörpers (anti-Maus-Biotin; 1:300 in PBS; 2×10^{-6} % Biotin) inkubiert. Im nächsten Schritt wurde Avidin und Peroxidase-gekoppeltes Biotin, 1 : 100 verdünnt, für 30 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben und im Anschluß mit TRIS/NaCl-Puffer (10 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH 7,6) gewaschen. Die Detektion des gebundenen Systems über die Bildung eines schwerlöslichen Präzipitates wurde mit 0,5 mg 3,3-Diaminobenzidintetrahydroxychlorid (DAB; Sigma, Deisenhofen) pro ml TRIS/NaCl nach Zugabe von 0,01 % H₂O₂ durchgeführt. Die Präparate wurden dehydratisiert und im Anschluß mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

3.5. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte auf einem Personal Computer mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL 5.0 (Microsoft, Unterschleissheim). Die Analysen der Gruppen auf signifikante Unterschiede mit Hilfe des gepaarten Student's t-Tests wurden mit dem Statistikprogramm SigmaStat (Jandel Scientific, Corte Madera, USA) durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot (Jandel Scientific, Corte Made

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zu inflammatorischem Streß

4.1.1. LPS als Induktor eines inflammatorischen Stresses

Um das Immunsystem einem inflammatorischen Stress auszusetzen, wurden die Versuchstiere mit 10 µg/kg Lipopolysaccharid (LPS) aus *E. coli* i.p. behandelt. LPS wird als exogenes Pyrogen bezeichnet, das bei gramnegativer Sepsis freigesetzt wird. Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Injektionsvolumen an physiologischer Kochsalzlösung als Lösungsmittel.

4.1.2. Leukozytenzahl im Vollblut und Milzgewicht nach LPS-Gabe

3 Stunden nach LPS-Applikation konnte beobachtet werden, daß die Leukozytenzahl im Vollblut signifikant abgenommen hatte (Abb. 14). Nach 3 weiteren Stunden stieg sie langsam wieder an, und 24 Stunden nach Versuchbeginn lag sie über den Werten der Kochsalz-behandelten Kontrolltiere.

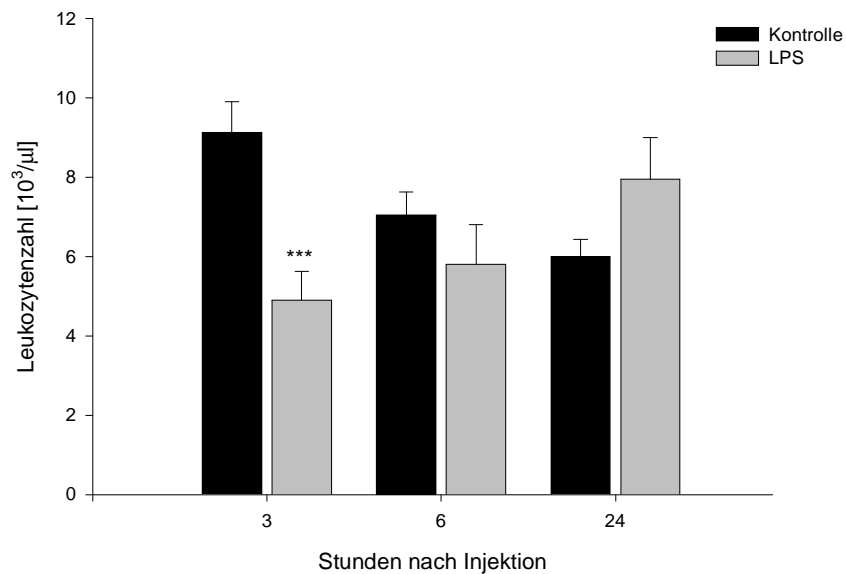


Abb.: 14 Deutliche Abnahme der Leukozytenzahl im peripheren Vollblut nach 10 $\mu\text{g/kg}$ LPS i.p. (N=10, MW \pm SEM, ***: $p < 0,001$)

Mit Abnahme der Blutleukozyten stieg 3 Stunden nach Verabreichung des inflammatorischen Stimulus in den LPS-behandelten Tieren das Milzgewicht signifikant an und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum von 24 Stunden erhöht (Abb. 15).

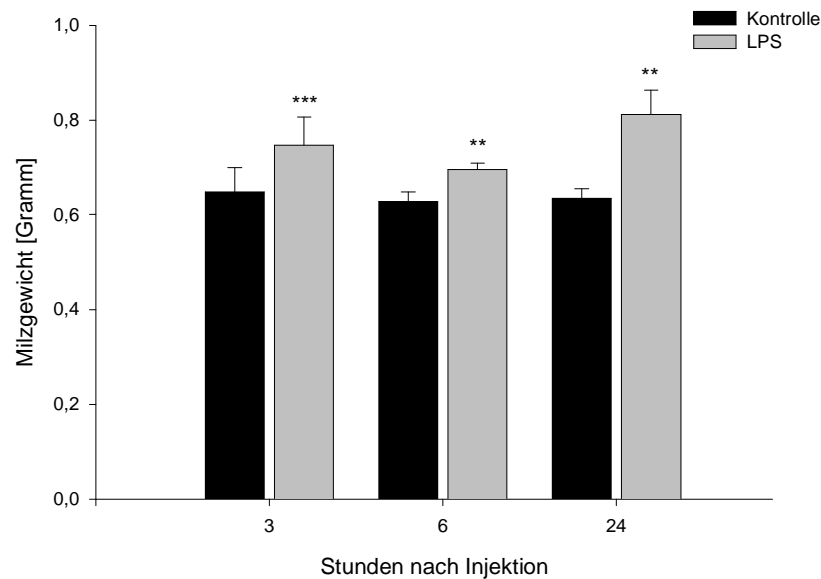


Abb.: 15 Signifikante Zunahme des Milzgewichtes nach 10 µg/kg LPS i.p. (N=10, MW±SEM, ***: p<0,001, **: p<0,01)

4.1.3. Einfluß von LPS auf die Körpertemperatur

Die Messung der Körpertemperatur sollte Aufschluß darüber geben, in welchem Zeitraum nach gramnegativer Bakterieninfektion (hier mit der Gabe von LPS simuliert) mit der Freisetzung endogener Pyrogene wie IL-1 β und TNF- α zu rechnen ist. Nach LPS-Gabe zeigten die Tiere einen typischen, biphasischen Fieberverlauf. Bereits vor dem Eingriff stieg bei den Tieren wegen Störung ihrer Ruhe die Körpertemperatur an, bedingt durch Aufnahme motorischer Aktivitäten. Nach der LPS-Gabe fiel die Temperatur zunächst wieder ab (Abb. 16).

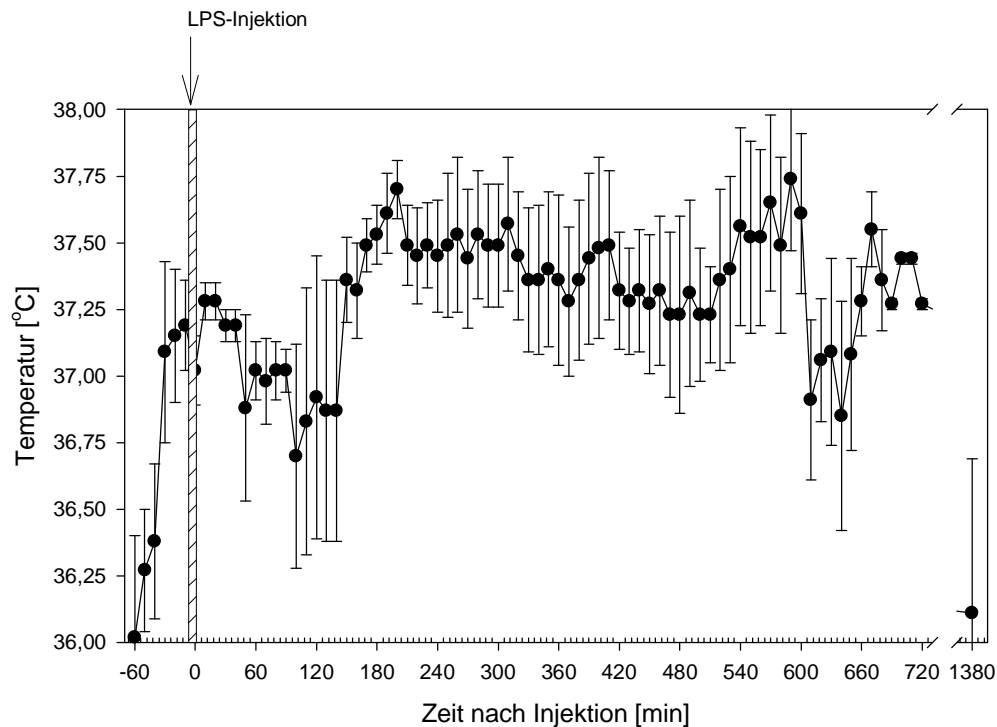


Abb.: 16 Körpertemperaturverlauf nach 10 µg/kg LPS i.p. (N=5, MW±SEM)

Etwa eine Stunde nach Injektion zeigten die LPS-behandelten Tiere schon die für systemische Entzündungen typischen Verhaltensauffälligkeiten wie erhöhte Atemfrequenz, Appetitlosigkeit und gesteigertes Schlafbedürfnis. Drei Stunden nach LPS-Gabe stieg die Körpertemperatur erneut auf durchschnittlich 37,6 °C an, um dann nach 6 Stunden wieder abzufallen. Dieses Temperaturmuster entsprach den schon früher berichteten Veränderungen nach exogener Pyrogen-Gabe in Ratten und Mäusen (Cao et al., 1995).

4.1.4. Proinflammatorisches TNF- α , IL-1 β und IL-6 im Serum

Die ersten bei einer Infektion im Serum nachweisbaren Zytokine stellen TNF- α und IL-1 β der Monozyten dar, welche nur zum Teil intrazellulär präformiert vorliegen und überwiegend nach LPS-Gabe neusynthetisiert werden. Bereits 30 min nach einer LPS-Gabe konnte ein signifikant erhöhter TNF- α Serum-Spiegel von $26,48 \pm 12,49$ pg/ml gegenüber $1,38 \pm 1,38$ pg/ml der Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 17). Die TNF- α -Freisetzung hielt nur über 3 h an. Nach 6 h waren bereits wieder Serum-Normalwerte erreicht.

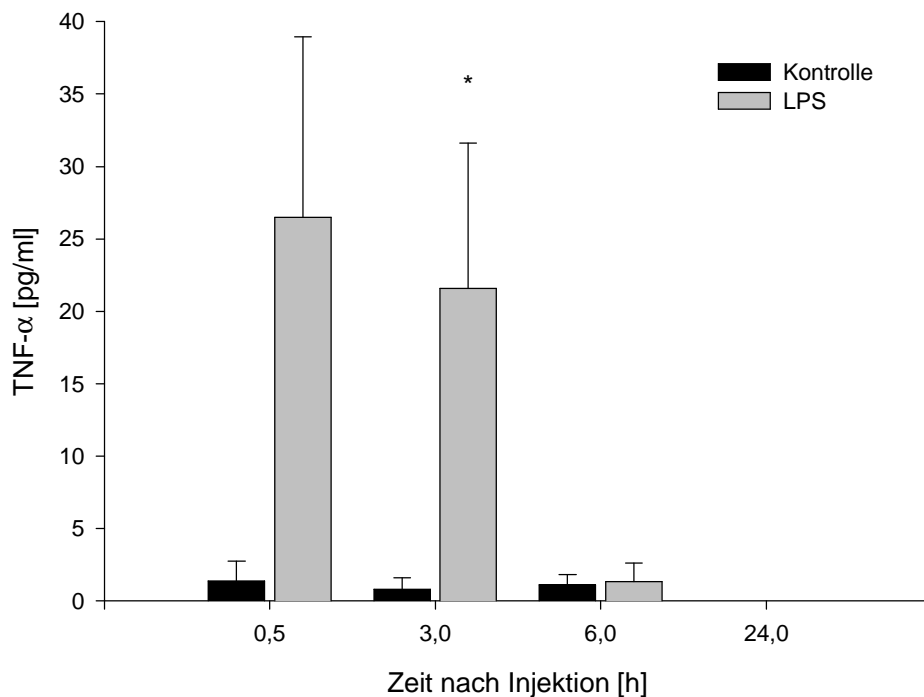


Abb.: 17 Kurzzeitige TNF- α -Freisetzung ins Serum nach 10 μ g/kg LPS i.p. (N=10, MW \pm SEM, *: p<0,05)

IL-1 β war in der LPS-behandelten Gruppe gegenüber den Kontrolltieren in geringeren Konzentrationen nachzuweisen. Nach 24 h war das Serum-IL-1 β gegenüber den 3- und 6-Stunden-Werten sogar signifikant reduziert (Abb.

18). Somit verhielt sich nach LPS-Stimulation die IL-1 β -Serum-Konzentration völlig gegensätzlich zu der von TNF- α , was nicht den Erwartungen entsprach.

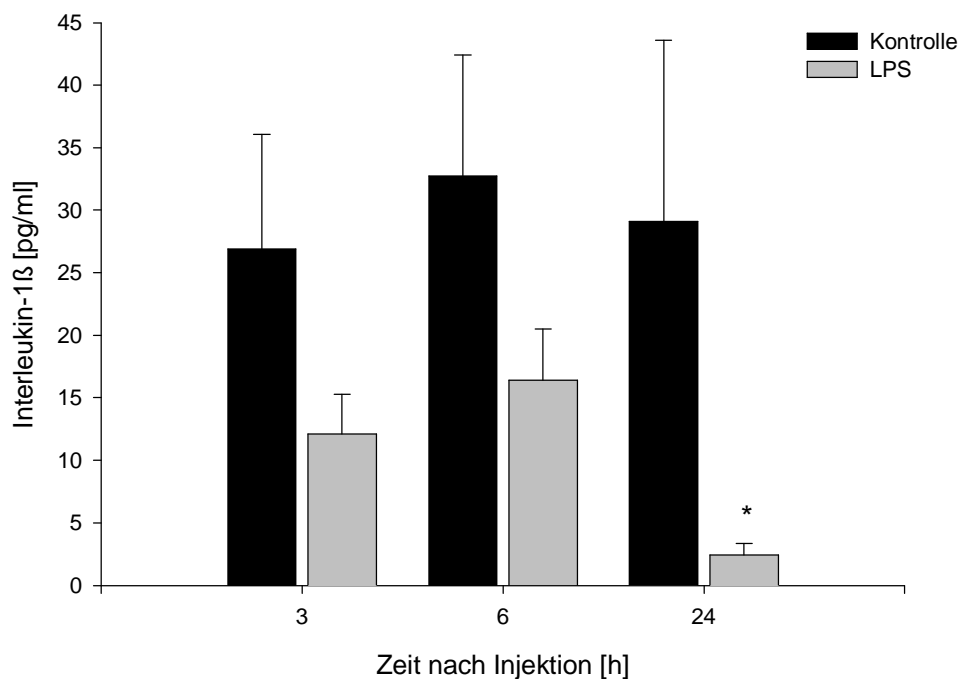


Abb.: 18 Reduzierte IL-1 β -Konzentrationen im nativen Serum nach 10 μ g/kg LPS i.p. (N=10, MW \pm SEM, *: p<0,05)

Die Tatsache, daß nach LPS-Behandlung gerade in der Initialphase einer Entzündung weniger Interleukin-1 β im Serum nachweisbar war, könnte entweder mit einer schon früh greifenden endogenen Immunsuppression oder mit einem endogenen Komplexbildner begründet werden, welcher einen Teil des basalen Proteins und des zusätzlich sezernierten Interleukin-1 β bindet. Dieser Komplex würde dann in einem Sandwich-ELISA von den Antikörpern nicht mehr erkannt und nachgewiesen werden. In einem weiteren Experiment wurde deshalb ein Teil der gleichen Serumproben mit 2% Triton-X100, einem

milden Detergenz zur Auflösung von Proteinkomplexen, versetzt und IL-1 β erneut mittels ELISA gemessen. Das Ergebnis zeigt deutlich, daß 3 bis 6 Stunden nach LPS-Stimulation vermehrt Interleukin-1 β in das Serum sezerniert wurde und erst nach 24 Stunden ein inhibitorischer Mechanismus die Bildung unterdrückte (Abb. 19).

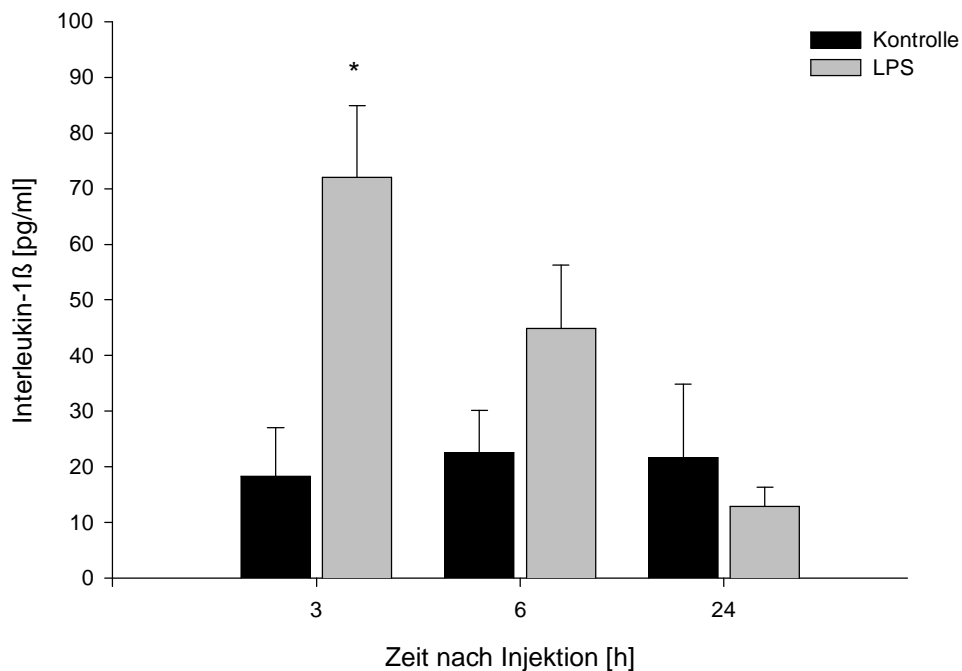


Abb.: 19 Signifikant erhöhte IL-1 β -Konzentrationen im Detergenz-behandelten Serum nach 10 μ g/kg LPS i.p. (N=4, MW \pm SEM)

Bei der Wiederholung der TNF- α -Bestimmung mit Detergenz behandeltem Serum ergab sich kein Unterschied zu den gemessenen Proteinkonzentrationen der nativen Serumproben. Es kann davon

ausgegangen werden, daß das gemessene TNF- α der gesamten sezernierten Menge entsprach.

Interleukin-6 konnte zu keinem Zeitpunkt, weder mit noch ohne Detergenz im Serum nachgewiesen werden.

4.1.5. Serum-Kortikosteron nach intraperitonealer LPS-Applikation

Schon bald nach Beginn einer Infektion wird durch peripher freigesetzte Zytokine wie IL-1 β die HPA-Achse aktiviert, was letztendlich die Freisetzung von Kortikosteron aus der Nebennierenrinde zur Folge hat. Mit seinen immunsuppressiven Eigenschaften wird systemisch die weitere Produktion von Immunmediatoren unter Kontrolle gehalten, um ein Entgleisen der Immunantwort in den septischen Schock zu vermeiden. Während sich 30 min nach LPS-Injektion noch keine Veränderungen der Serum-Kortikosterons bemerkbar machten, wurden nach 3 Stunden signifikant erhöhte Kortikosteron-Konzentrationen im Serum festgestellt, welche sich über 6 Stunden hielten, bis 24 Stunden nach der Infektion wieder Normalwerte auftraten (Abb. 20).

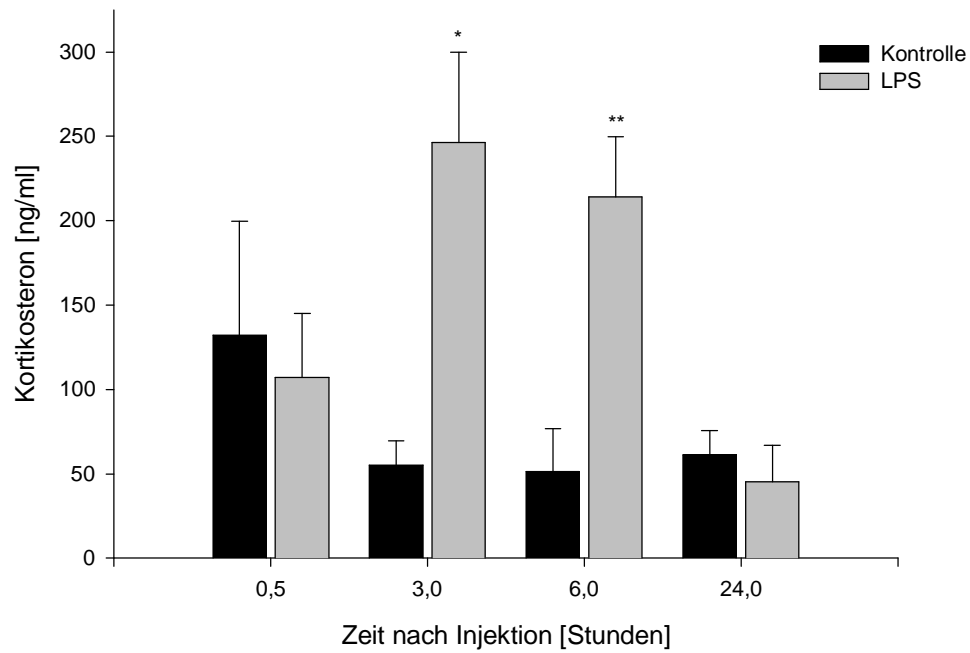


Abb.: 20 Erhöhung des Serum-Kortikosterons nach 10 µg/kg LPS i.p. als Marker für eine aktivierte HPA-Achse (N=10, MW±SEM, *: P<0,05, **: p<0,01)

4.1.6. Genexpression im hippokampalen Gewebe

4.1.6.1. Konstitutiv exprimierte Gene

Um PCR-amplifizierte cDNA verschiedener Proben semiquantitativ vergleichen zu können, muß gewährleistet sein, daß die mRNA-Isolierung aller Proben mit der gleichen Effizienz erfolgt, so daß die beobachteten Unterschiede in der Expression spezifischer Transkripte nicht auf unregelmäßige mRNA-Ausbeuten bei der Präparation zurückzuführen ist. Liegt als Ausgangsmatrize für die PCR RNA bzw. DNA vor, läßt sich deren Konzentration photometrisch bestimmen und durch Verdünnung angleichen. Da in dieser Arbeit jedoch mRNA isoliert wurde, deren Konzentration im stimulierten Gewebe per se erhöht ist, hätte ein Abgleich auf gleiche Mengen zur Folge, daß eine verstärkte Expression eines spezifischen Transkriptes in den behandelten Proben nach Verdünnung PCR-technisch nicht mehr beobachtet werden kann.

Eine Alternative stellt hierbei der Vergleich der Proben bezüglich eines unregulierten, d.h. konstitutiv exprimierten Gens dar. Für diese Methode geeignet sind sogenannte „housekeeping Gene“, welche ubiquitär d.h. gewebeunspezifisch exprimiert werden und keiner Regulation unterliegen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden, wie üblich die Transkripte der Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) (Tso, et al 1985) und des β -Aktins (Spanakis und Brouty-Boye, 1994) herangezogen worden.

4.1.6.1.1. Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase-Expression

Die Auswertung der RT-PCR hippokampaler GAPDH-mRNA zeigte, daß 3, 6 und 24 h nach LPS-Gabe keine Unterschiede zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe vorlagen (Abb. 21-23). Dieser Befund bestätigte die Brauchbarkeit des unregulierten GAPDH-Transkriptes als Anhaltspunkt für eine einheitliche mRNA-Isolierung aus dem Gewebe. Ein Nachteil der

Verwendung liegt in der schwachen Bandenintensität der PCR-Produkte bei moderaten Zyklenzahlen (25-33).

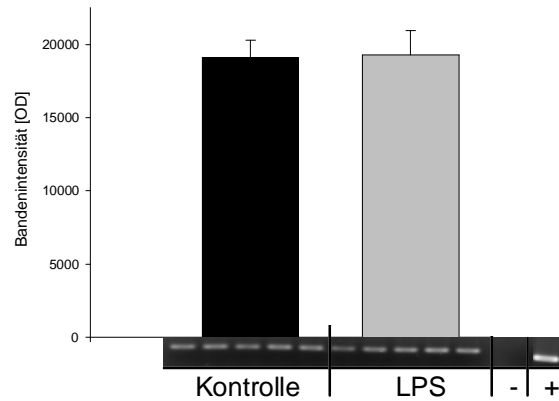


Abb.: 21 GAPDH-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (28 PCR-Zyklen)

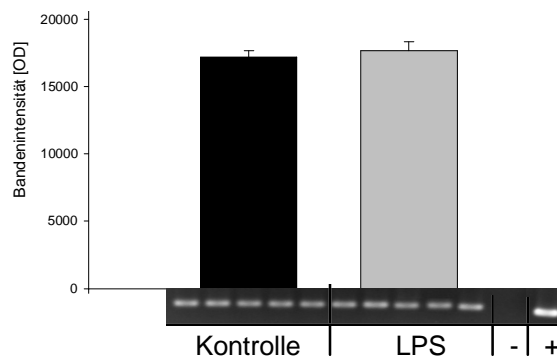


Abb.: 22 GAPDH-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (28 PCR-Zyklen)

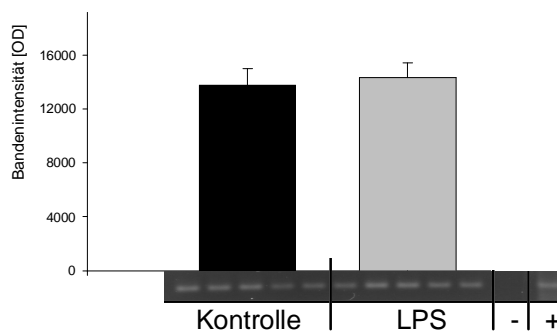


Abb.: 23 GAPDH-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (28 PCR-Zyklen)

4.1.6.1.2. β -Aktin-Expression

Das üblicherweise als konstitutiv exprimiert angesehene β -Aktin-Transkript zeigte im Hippokampus schon 3 h nach LPS-Injektion eine signifikante Hochregulation gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 24).

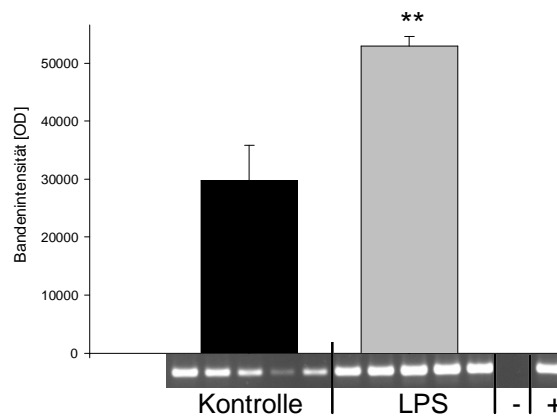


Abb.: 24 β -Aktin-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (28 PCR-Zyklen)

Dieser erhöhte mRNA-Gehalt des Gewebes war noch nach 6 h zu beobachten (Abb. 25) und ging selbst nach 24 h nicht auf die Werte der Kontrollgruppe zurück (Abb. 26).

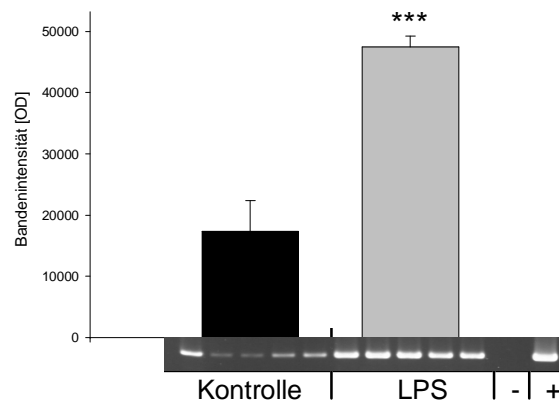


Abb.: 25 β -Aktin-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (28 PCR-Zyklen)

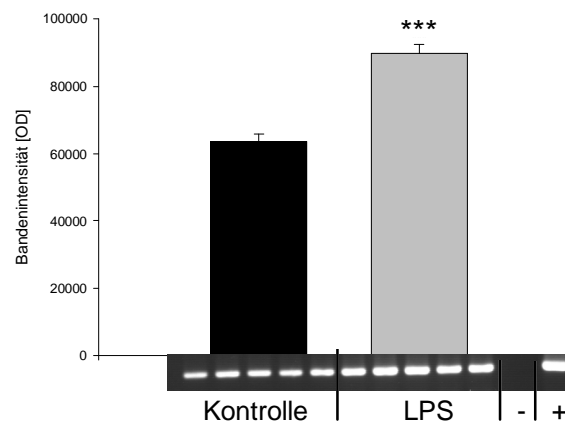


Abb.: 26 β -Aktin-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (28 PCR-Zyklen)

4.1.6.1.3. Lysozym-Expression

Als sich herausstellte, daß das β -Aktin-Transkript zwar eine starke Basalexpression zeigte, jedoch wegen seiner LPS-induzierten Hochregulation nicht als mRNA-Präparationsmarker dienen konnte, wurde nach einem Transkript gesucht, welches im ZNS konstitutiv exprimiert wird und mit einer hohen Basalexpression wenig Amplifikationszyklen in der PCR zur Detektion benötigt. Dazu gut geeignet ist Lysozym-Transkript der Mikroglia (Zucker-Franklin et al., 1987). Dieses konstitutiv exprimierte Gen zeigte zu allen drei Zeitpunkten der Beobachtung (3, 6 und 24 h) nach LPS-Gabe keine signifikanten Veränderung und ließ sich zudem noch nach 33 Zyklen in einer gut auswertbaren Bandenstärke ablesen (Abb. 27-29).

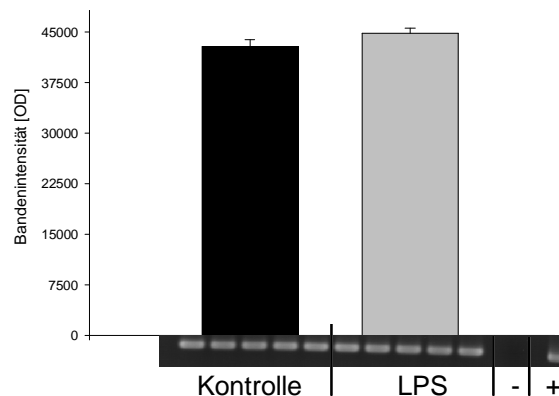


Abb.: 27 Lysozym-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (33 PCR-Zyklen)

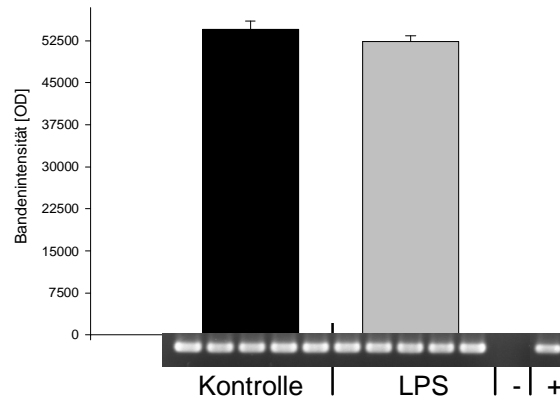


Abb.: 28 Lysozym-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (33 PCR-Zyklen)

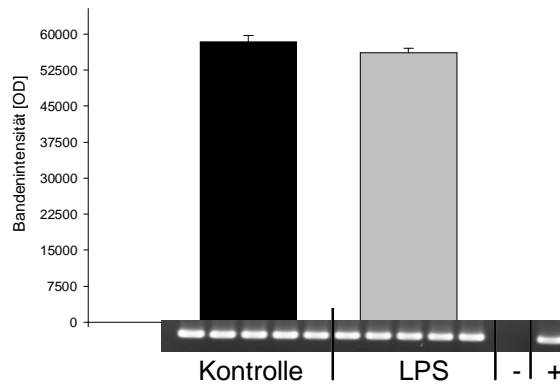


Abb.: 29 Lysozym-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (33 PCR-Zyklen)

4.1.6.2. Expression von Zytokinsynthese-relevanten Transkriptionsfaktoren und Onkogenen

Um einen Hinweis auf eine LPS-induzierte Immunantwort im Hippokampus zu bekommen, wurde die Expression der für die Regulation der Zytokine notwendigen Transkriptionsfaktoren und Onkogene untersucht, soweit deren Funktion und Sequenz in der Ratte bekannt sind.

4.1.6.2.1. Expression von NF- κ B

Für viele proinflammatorischen Zytokine wie z.B. TNF- α und IL-1 β konnte eine NF- κ B-Bindungsstelle im Promotor nachgewiesen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, daß NF- κ B einen zentralen Transkriptionsfaktor für die Zytokinexpression darstellt. Eine Analyse der Expression dieses Transkriptionsfaktors im zytokininduzierenden LPS-Modell sollte Hinweise auf die Rolle des NF- κ B bei der Regulation der Zytokinsynthese geben. Die NF- κ BmRNA wies zu allen drei Zeitpunkten nach der LPS-Gabe eine unregulierte, nahezu konstitutive Expression auf (Abb. 30-32).

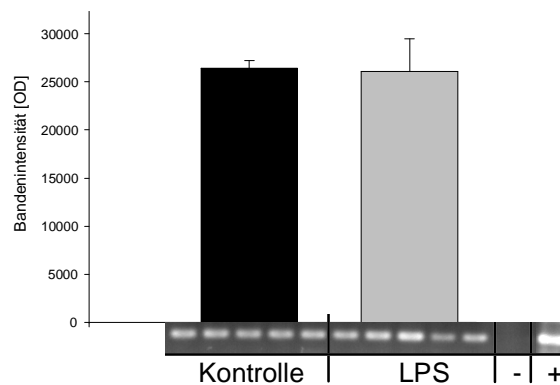


Abb.: 30 NF- κ B -mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (33 PCR-Zyklen)

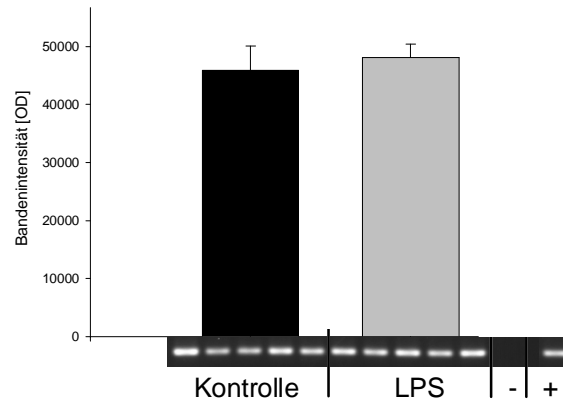


Abb.: 31 NF- κ B -mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (33 PCR-Zyklen)

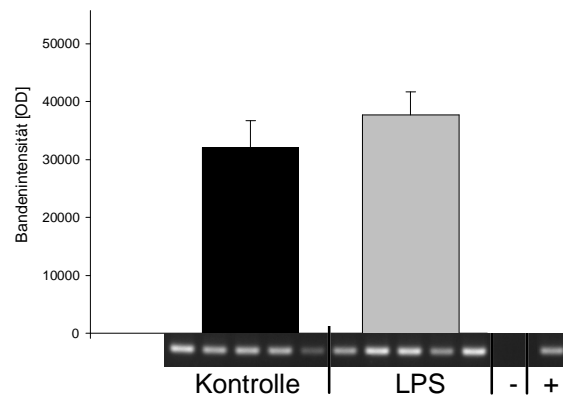


Abb.: 32 NF- κ B -mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (33 PCR-Zyklen)

4.1.6.2.2. Expression von I- κ B

Wenn die Aktivität von NF- κ B nicht transkriptionellen Mechanismen unterliegt, so läßt sie sich noch postranskriptionell durch Regulation seines Inhibitors I- κ B steuern. Ein völlig unerwarteter und bisher noch nicht beschriebener Befund war das reproduzierbare Ergebnis, daß sich die Expression von I- κ B 3 bis 6 Stunden nach LPS-Injektion im Hippokampus signifikant erhöhte (Abb. 33 und 34).

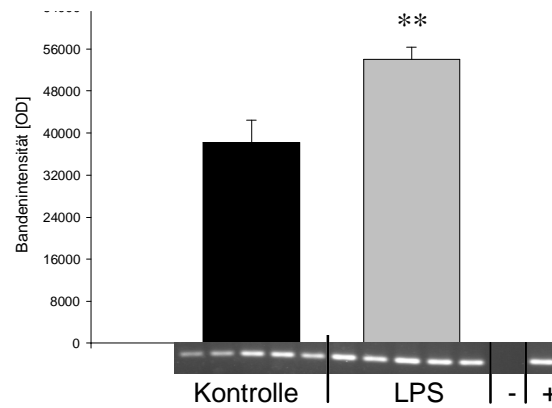


Abb.: 33 I- κ B -mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (33 PCR-Zyklen)

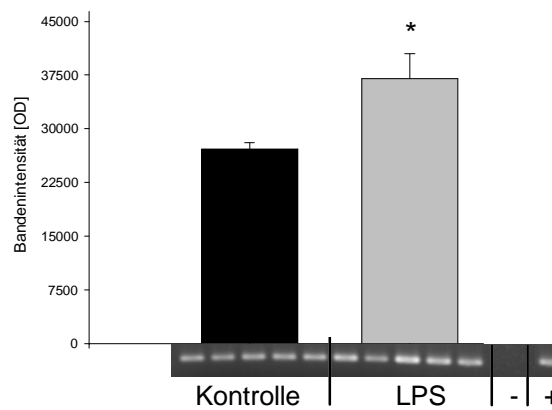


Abb.: 34 I- κ B -mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (33 PCR-Zyklen)

24 Stunden nach Beginn des inflammatorischen Stresses, ausgelöst durch intraperitoneale LPS-Injektion, ging die I- κ B-mRNA-Expression im Hippokampus wieder annähernd auf das Niveau der Kontrollen zurück (Abb.35).

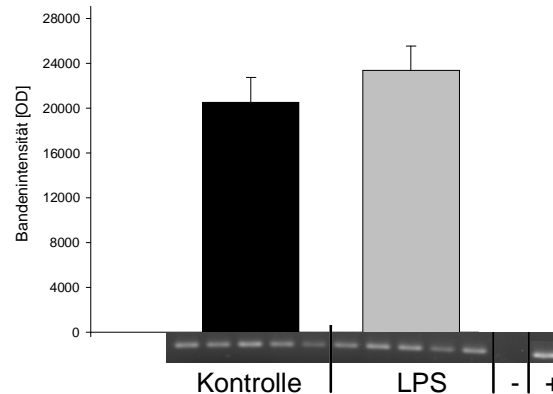


Abb.: 35 I- κ B -mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (33 PCR-Zyklen)

4.1.6.2.3. Die Expression von c-fos und c-jun

Der neben NF- κ B bekannte, für die Zytokinexpression mitverantwortliche Transkriptionsfaktor AP-1 (aktivierendes Protein-1) setzt sich aus den Faktoren c-fos und c-jun zusammen. Expressionsstudien von c-fos bzw. c-jun auf mRNA-Ebene sollten Hinweise auf eine Beteiligung von AP-1 bei der LPS-induzierten Zytokinproduktion im ZNS geben. 3 Stunden nach Verabreichung des inflammatorischen Stimulus wurde der Faktor c-fos deutlich stärker exprimiert (Abb. 36).

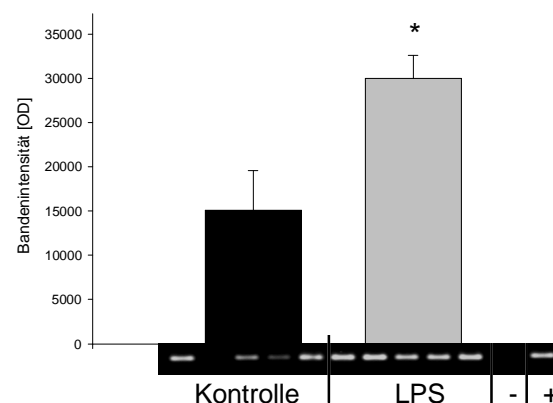


Abb.: 36 c-fos-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

Nach dieser Initialphase wurde 6 bzw. 24 Stunden nach LPS-Applikation nur noch eine der Kontrollgruppe gleichende Expression beobachtet (Abb. 37-38).

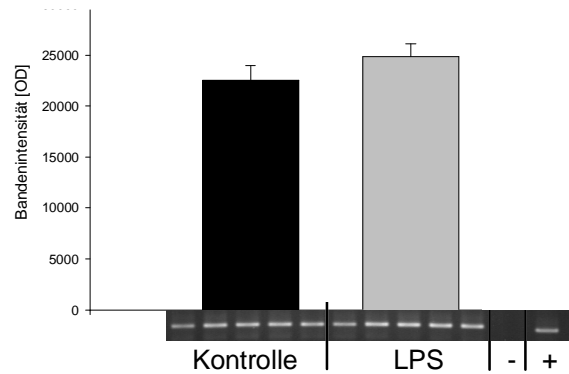


Abb.: 37 c-fos-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

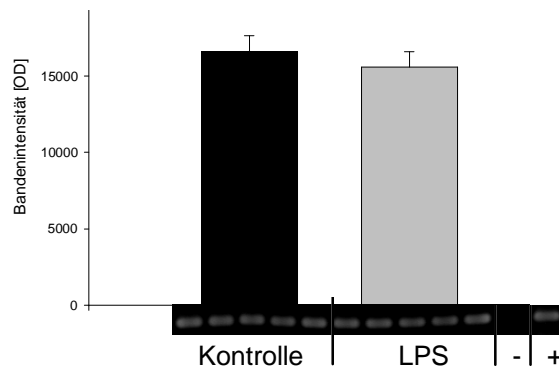


Abb.: 38 c-fos-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

Die mRNA des Onkogens c-jun, des zweiten Bestandteils von AP-1, war ebenfalls 3 Stunden nach LPS-Gabe signifikant erhöht (Abb. 39).

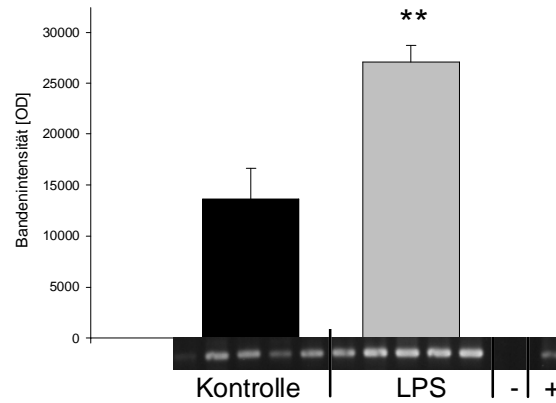


Abb.: 39 c-jun-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

6 und 24 Stunden nach LPS-Gabe wurde im Hippokampus wieder die c-jun-mRNA-Konzentrationen der Kontrollen erreicht (Abb. 40-41).

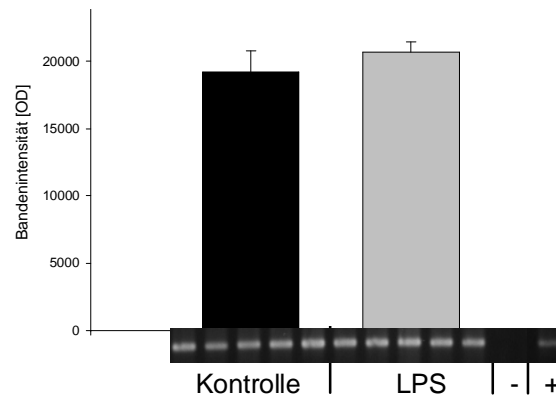


Abb.: 40 c-jun-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

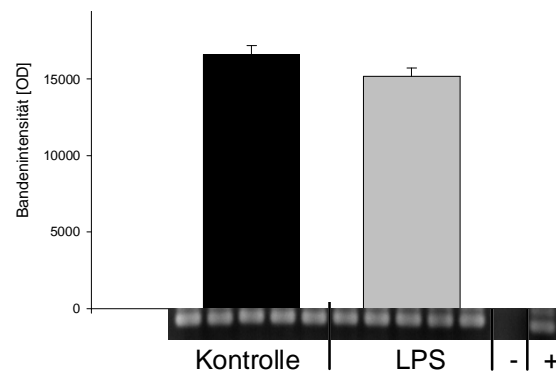


Abb.: 41 c-jun-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

4.1.6.3. Expression des Mineralkortikoid-Rezeptors (MCR)

Beim Nachweis einer LPS-stimulierten HPA-Achse mit erhöhtem Serum-Kortikosteron und angestiegener I- κ B-Induktion stellte sich die Frage nach Expressionsveränderungen des Mineralkortikoid-Rezeptors. Dieser intrazelluläre Rezeptor ist die Hauptbindungsstelle für Glukokortikoide im Zentralnervensystem. 3 Stunden nach Verabreichen des inflammatorischen Stressors LPS stieg die Expression von MCR zunächst leicht an (Abb. 42) und konnte zum 6 Stunden-Wert als signifikant erhöht nachgewiesen werden (Abb. 43). Zum 24 Stunden Beobachtungszeitpunkt näherte sich der MCR-mRNA-Gehalt wieder den Basalwerten (Abb. 44).

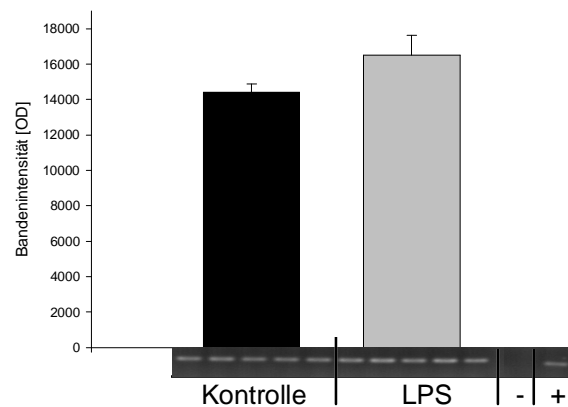


Abb.: 42 Leicht erhöhte MCR-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

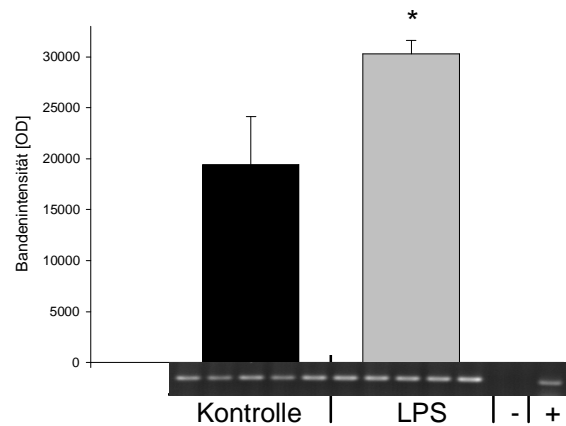


Abb.: 43 Signifikant erhöhte MCR-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

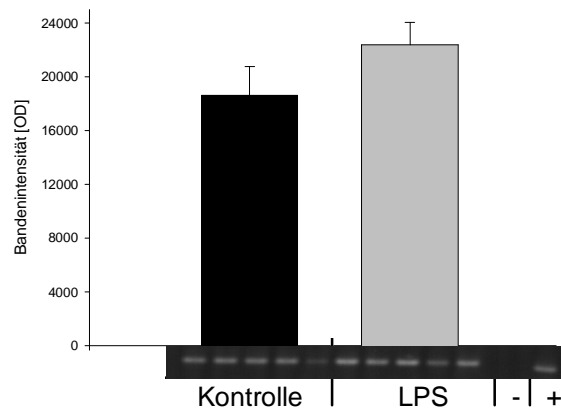


Abb.: 44 Sich langsam wieder den Basalwerten annähernde MCR-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

4.1.6.4. Zytokin-Expression

4.1.6.4.1. Tumor-Nekrose-Faktor-α-Expression

Die mRNA des Tumor-Nekrose-Faktor-α zeigt sich über 6 Stunden nach Beginn des inflammatorischen Stresses im Hippokampus signifikant erhöht (Abb. 45 und 46). 24 Stunden nach LPS-Gabe war die Expression, wenn auch nicht signifikant, reduziert (Abb. 47).

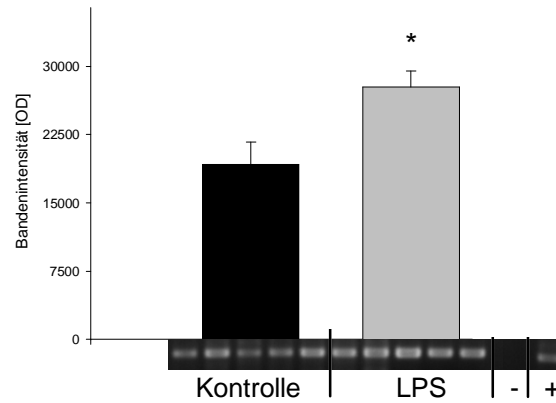


Abb.: 45 Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen)

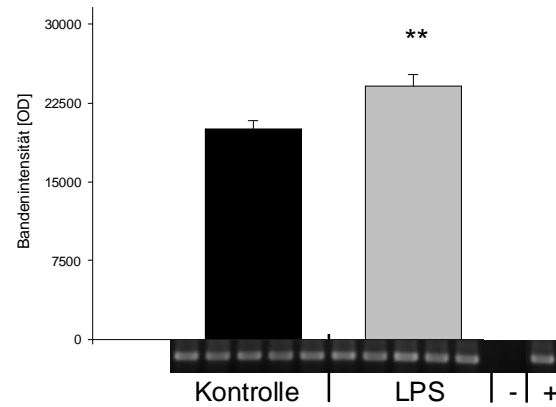


Abb.: 46 Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen)

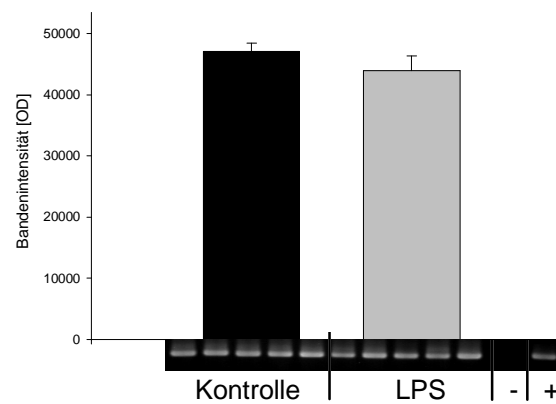


Abb.: 47 Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen)

Obwohl das mRNA-Expressionsmuster auch einen deutlichen Anstieg der TNF- α -Synthese vermuten ließ, konnten im Homogenat des hippokampalen Gewebes zu keinem der beobachteten Zeitpunkte nach LPS-Applikation Veränderungen in der TNF- α -Proteinkonzentration festgestellt werden (Abb. 48).

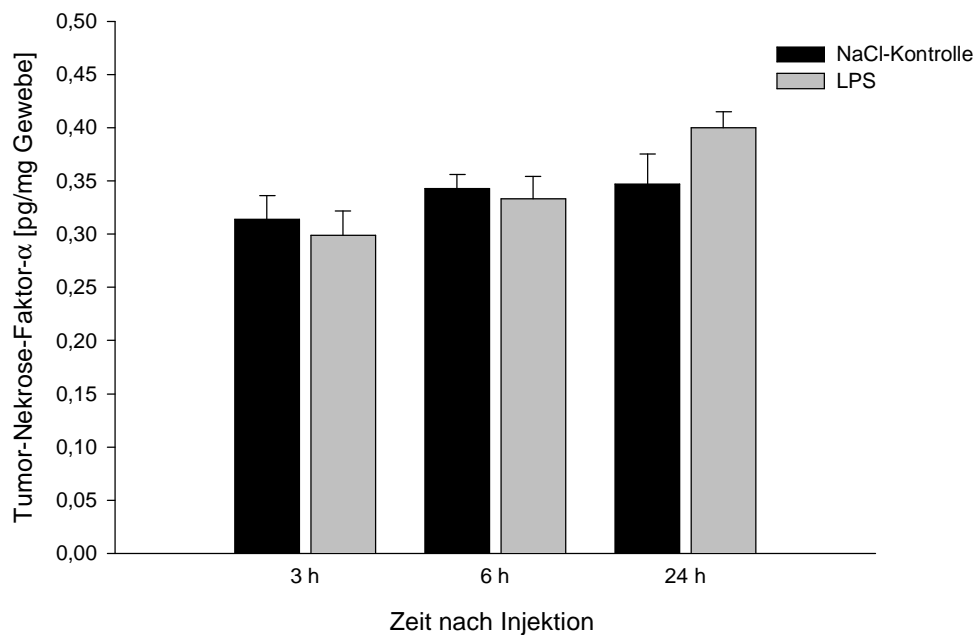


Abb.: 48 Tumor-Nekrose-Faktor- α -Protein blieb im gesamten Gewebe des Hippokampus 3, 6 und 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. unverändert (N=4, MW \pm SEM)

4.1.6.4.2. Interleukin-1 β -Expression

Interleukin-1 β -mRNA wurde 3 Stunden nach LPS-Gabe im hippokampalen Gewebe signifikant verstärkt exprimiert (Abb. 49). Diese verstärkte Produktion von Transkripten war noch über 6 Stunden zu beobachten (Abb. 50), bis nach 24 Stunden wieder Kontrollwerte erreicht wurden (Abb. 51).

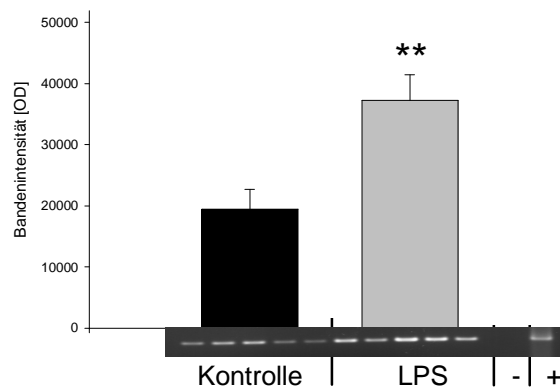


Abb.: 49 Interleukin-1 β -mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen)

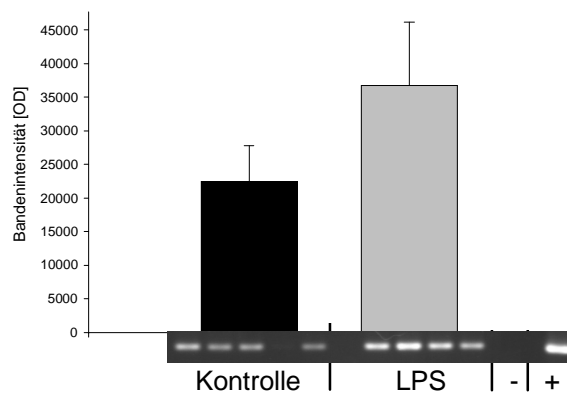


Abb.: 50 Interleukin-1 β -mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (35 PCR-Zyklen)

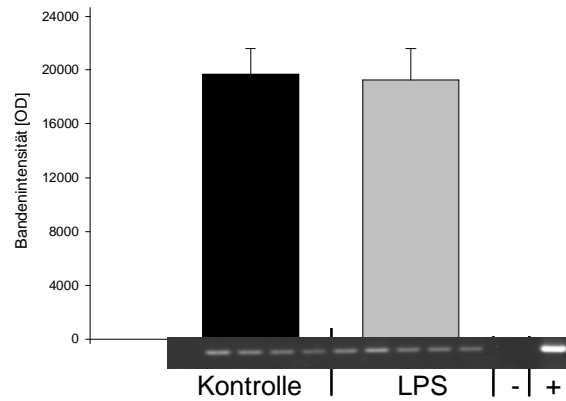


Abb.: 51 Interleukin-1 β -mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (35 PCR-Zyklen)

Erstaunlicherweise war die basale Interleukin-1 β -Protein-Konzentration im Hippokampus mit durchschnittlich 550 pg/mg Gewebe im Vergleich zu TNF- α relativ hoch. Wie bereits bei TNF- α zu beobachten war, konnte die signifikante Zunahme der IL1 β -mRNA auf der Ebene des Proteinnachweises nicht bestätigt werden. Die Auswertung des IL-1 β ELISA ergab keine Veränderungen im Gesamtproteingehaltes des Hippokampus nach LPS-Applikation (Abb. 52)

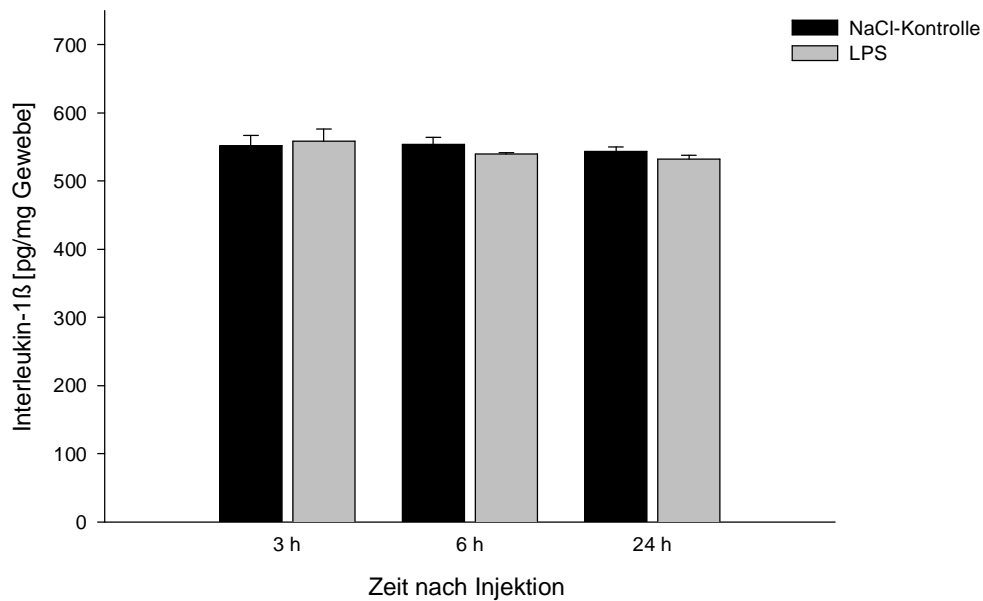


Abb.: 52 Nahezu unveränderter Interleukin-1 β -Gehalt im Gesamtgewebe des Hippokampus 3, 6 und 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (N=4, MW \pm SEM)

4.1.6.4.3. Interleukin-6-Expression

Während der Hippokampus für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β innerhalb der ersten drei Stunden eine erhöhte Expression aufwies, zeigte die Interleukin-6-mRNA zu diesem Zeitpunkt noch keine deutlichen Veränderungen (Abb. 53). Erst nach 6 Stunden konnte eine signifikante Steigerung der mRNA-Transkription nachgewiesen werden (Abb. 54). 24 Stunden später wurden wieder Normalwerte erreicht (Abb. 55).

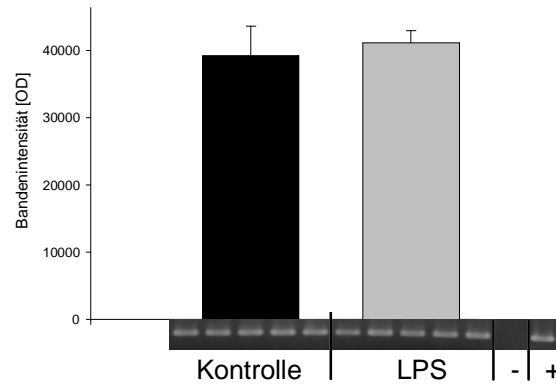


Abb.: 53 Interleukin-6-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (35 PCR-Zyklen)

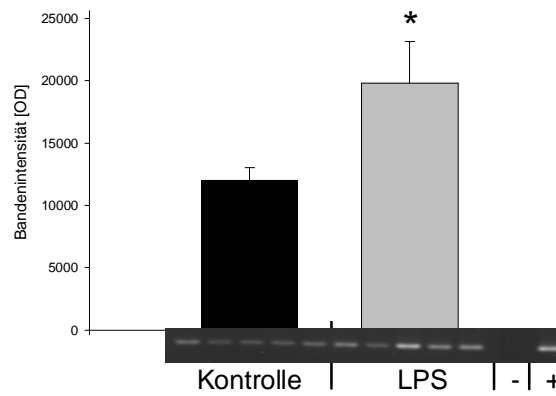


Abb.: 54 Interleukin-6-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (35 PCR-Zyklen)

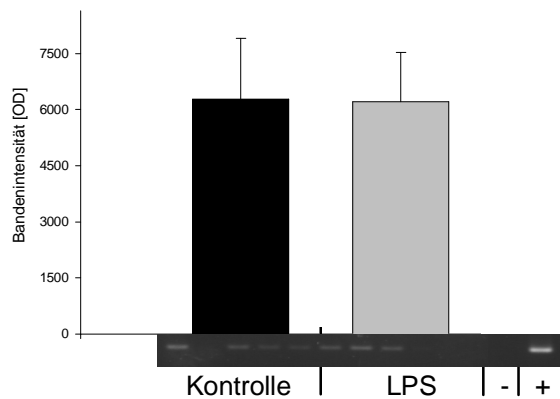


Abb.: 55 Interleukin-6-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (35 PCR-Zyklen)

Der Nachweis des Proteins Interleukin-6 im Hippokampus konnte aufgrund starker Streuung der Kontrollen statistisch keine signifikanten Veränderungen aufzeigen. Es zeichnete sich jedoch ab, daß sich die 6 Stunden nach LPS-Gabe festgestellte erhöhte IL-6-mRNA-Expression nach 24 Stunden in einer Zunahme des IL-6-Proteingehaltes auswirkte (Abb. 56).

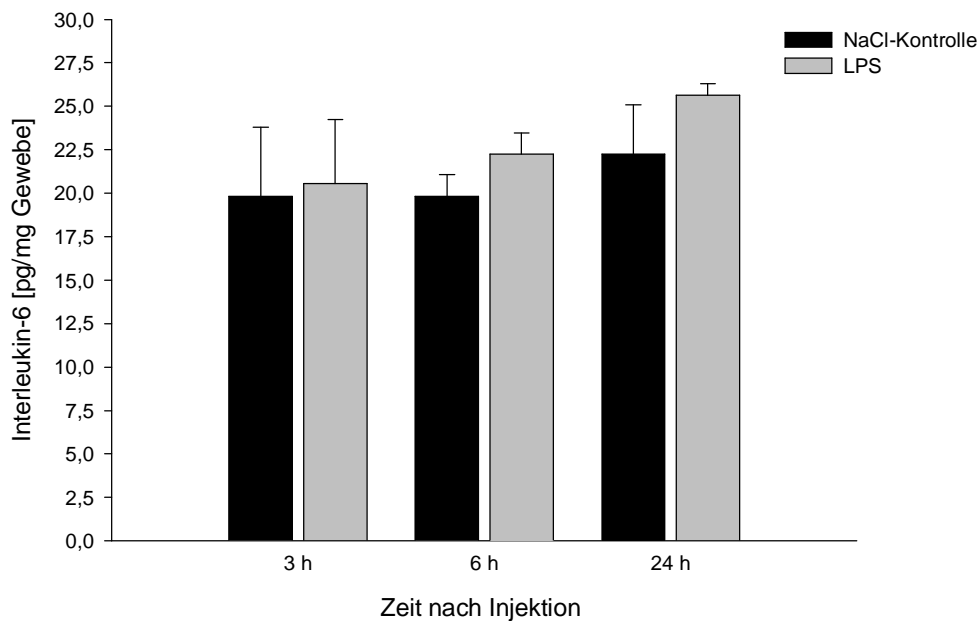


Abb.: 56 Keine signifikanten Veränderungen des Interleukin-6-Proteins im Gesamtgewebe des Hippokampus 3, 6 und 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (N=4, MW±SEM)

4.1.6.4.4. Expression von Interleukin-2 und Interleukin-4

Bis zu einer Zyklenzahl von 40 konnte zu keinem Zeitpunkt für Interleukin-2 (Abb. 47) und Interleukin-4 (Abb. 48) eine mRNA im Hippokampus nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, daß die im Hippokampus lokalisierten Zellen kein Interleukin-2 und 4 basal exprimieren bzw. nach einem peripheren LPS-Stimulus eine de novo Synthese begannen.

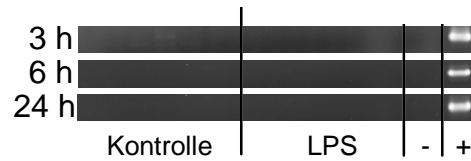


Abb.: 57 Interleukin-2-mRNA-Expression im Hippokampus 3, 6 und 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (40 PCR-Zyklen)

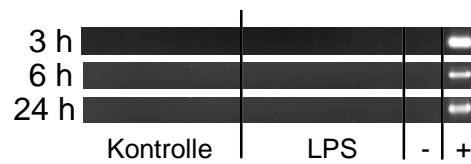


Abb.: 58 Interleukin-4-mRNA-Expression im Hippokampus 3, 6 und 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (40 PCR-Zyklen)

4.1.6.4.5. Expression von Transforming-Growth-Factor-β

Nach den Beobachtungen, daß im Hippokampus einige proinflammatorischen Zytokine nach peripherer LPS-Applikation verstärkt exprimiert wurden, stellte sich die Frage, ob der Transforming-Growth-Factor-β (TGF-β), ein Zytokin mit einer Reihe von inhibitorischen Eigenschaften, wie z.B. der Hemmung der Lymphozytenmigration, der Entzündungsreaktion entgegenwirkt. Die Expression von TGF-β-mRNA blieb zunächst in den ersten 3 Stunden nach LPS-Injektion unverändert (Abb. 59).

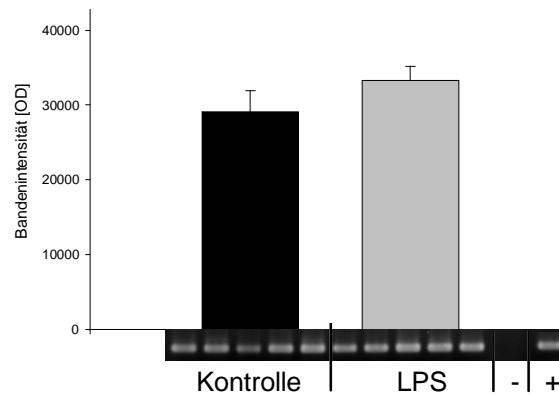


Abb.: 59 TGF- β -mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen)

6 Stunden nach Gabe des LPS-Stimulus war die Anzahl der TGF- β -Transkripte im Hippokampus signifikant reduziert (Abb. 60)

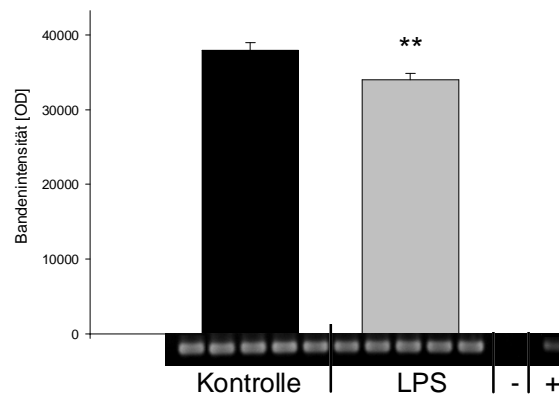


Abb.: 60 TGF- β -mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen)

Dieser Effekt konnte auch noch nach 24 Stunden, jedoch weniger deutlich, beobachtet werden (Abb. 61).

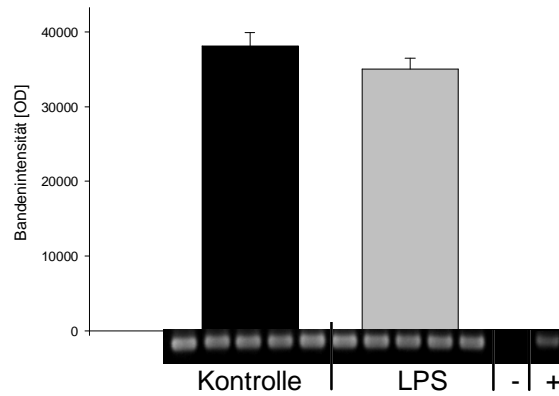


Abb.: 61 TGF- β -mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen)

Somit war TGF- β das einzige Zytokin im Hippokampus, das in der Initialphase der ersten 6 Stunden nach Eintreten einer peripheren Entzündung eine reduzierte mRNA-Expression aufwies, was auf eine möglicherweise reduzierte Proteinbiosynthese hindeutet.

4.1.6.5. Expression von Chemokin-mRNA

Die gezielte Einwanderung von Leukozyten in ein entzündetes Gewebe wird zu einem erheblichen Teil durch Chemokine veranlaßt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb im Hinblick auf eine mögliche Infiltration des Hippokampus mit Leukozyten die CC-Chemokine MIP-1 α , RANTES und MCP-1 sowie das CXC-Chemokin Gro- α untersucht.

4.1.6.5.1. Expression von MIP-1 α

Im Hippokampus zeigte sich 3 h nach peripherer LPS-Applikation eine deutliche Zunahme der MIP-1 α -mRNA-Expression (Abb. 62) Diese mRNA-Akkumulation fiel nach 6 h geringer aus (Abb. 63) und nach 24 h zeichnete sich sogar eine leichte Suppression ab (Abb. 64).

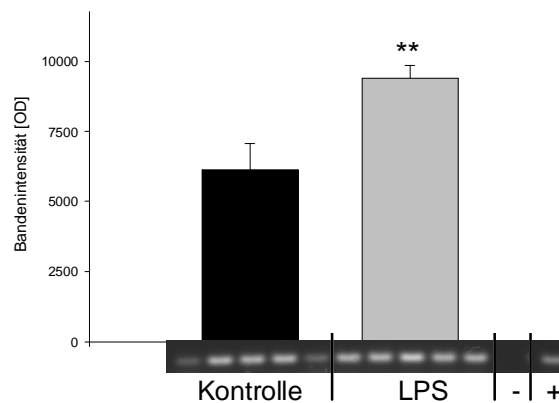


Abb.: 62 Verstärkte MIP-1 α -mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen, **: $p < 0,01$)

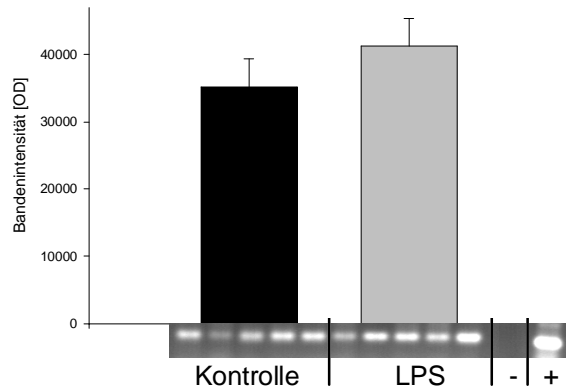


Abb.: 63 MIP-1 α -mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

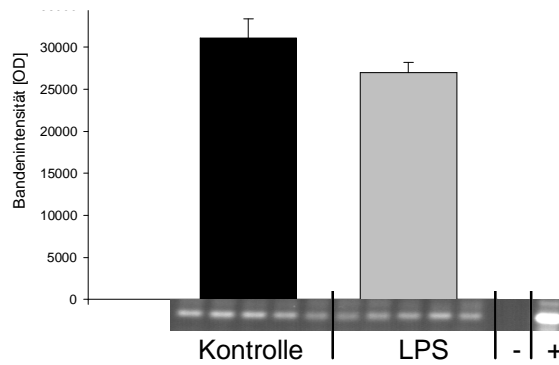


Abb.: 64 MIP-1 α -mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

4.1.6.5.2. Expression von RANTES

Ähnlich wie MIP-1 α verhielt sich auch die mRNA-Expression von RANTES. 3 Stunden nach Infektion war der RANTES-mRNA-Gehalt des Hippokampus signifikant erhöht (Abb. 65). Nach 6 Stunden war die verstärkte Expression rückläufig (Abb. 66) bis schließlich nach 24 Stunden Normalwerte erreicht wurden (Abb. 67).

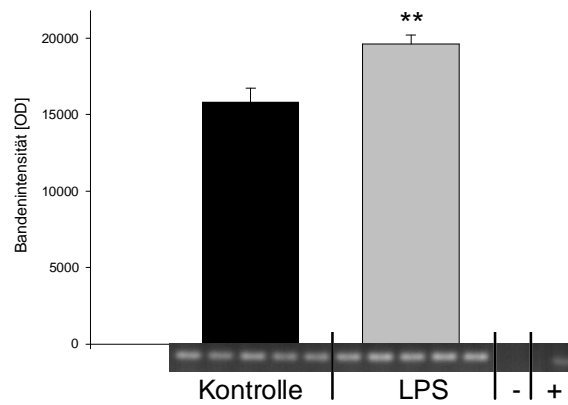


Abb.: 65 RANTES-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (36 PCR-Zyklen, **: p<0,01)

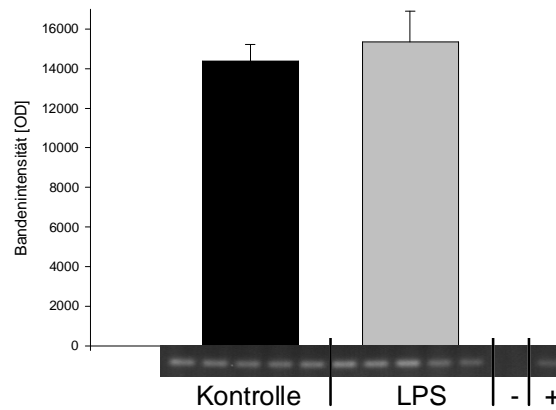


Abb.: 66 RANTES-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (36 PCR-Zyklen)

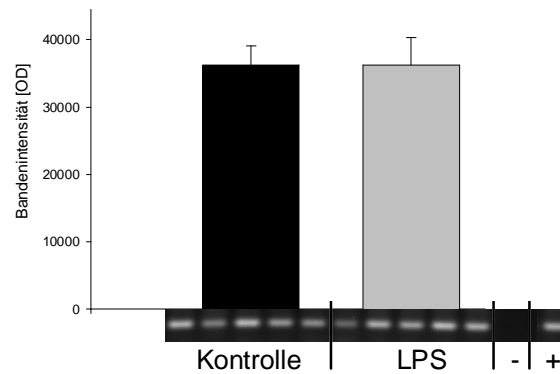


Abb.: 67 RANTES-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (36 PCR-Zyklen)

4.1.6.5.3. Expression von MCP-1

MCP-1 zeigte ein von den übrigen CC-Chemokinen abweichendes Expressionsmuster. Zum einen wurde es wesentlich schwächer exprimiert, zum anderen war 3 Stunden nach LPS-Stress in der Gruppe der behandelten Tiere ein eher reduzierter MCP-1-mRNA-Gehalt im Hippokampus zu beobachten (Abb. 68). Diese Veränderung war jedoch nicht signifikant.

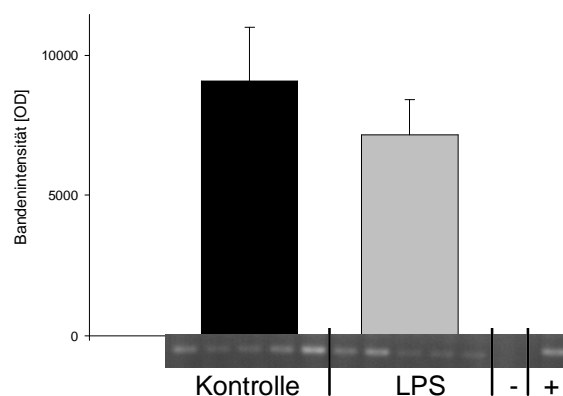


Abb.: 68 MCP-1-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (36 PCR-Zyklen)

6 Stunden nach Beginn der Entzündung waren bei der MCP-1-Expression keine Veränderungen sichtbar (Abb. 69).

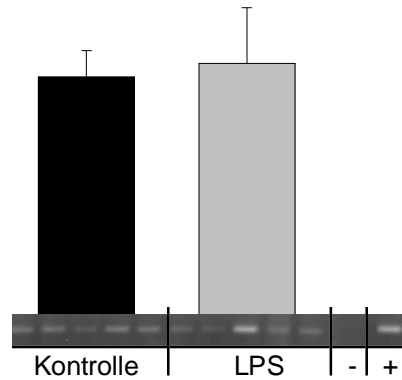


Abb.: 69 MCP-1-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (36 PCR-Zyklen)

Auch nach weiteren 18 Stunden zeigten sich keine signifikanten Veränderungen von MCP-1-mRNA im hippokampalen Gewebe (Abb. 70). Diese Befunde zeigen, daß MCP-1 bei inflammatorischem Stress im Hippokampus wahrscheinlich keiner Regulation unterliegt.

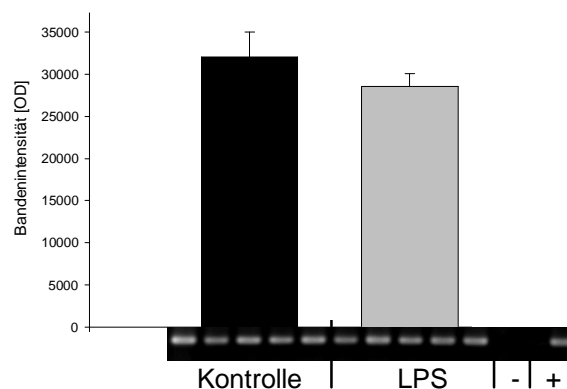


Abb.: 70 MCP-1-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen)

4.1.6.5.4. Expression von Gro- α

Das CXC-Chemokin Gro- α wurde nach 3 Stunden im Hippokampus der LPS-behandelten Versuchstiere signifikant stärker exprimiert als in den Gehirnarealen der Kontrollen (Abb. 71).

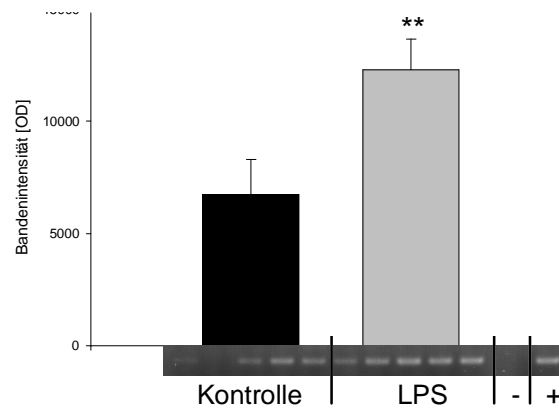


Abb.: 71 Gro- α -mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (36 PCR-Zyklen, **: $p < 0,01$)

Diese Aktivierung war sogar noch nach 6 Stunden deutlich nachweisbar (Abb. 72) und erst nach 24 Stunden waren die Gro- α -mRNA-Konzentrationen in Test- und Kontrollgruppe wieder gleich (Abb. 73).

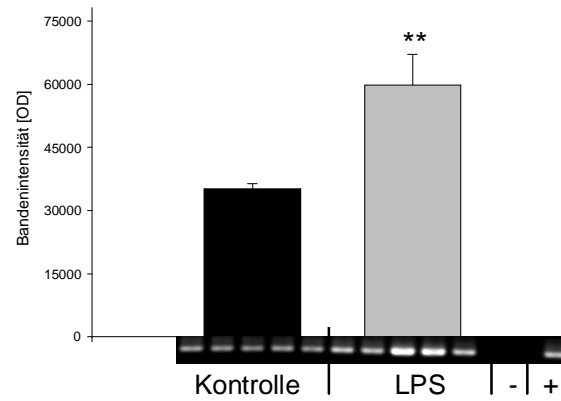


Abb.: 72 Gro- α -mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen, **: $p < 0,01$)

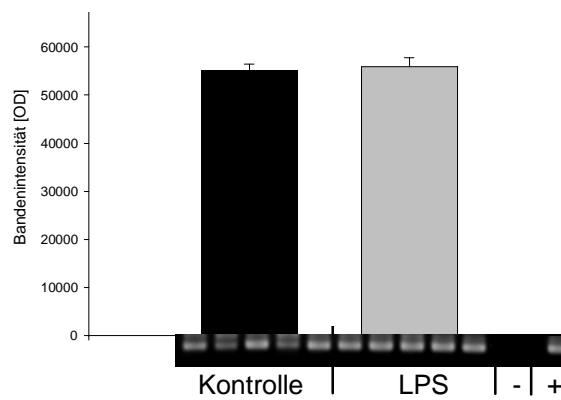


Abb.: 73 Gro- α -mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (37 PCR-Zyklen)

4.1.6.6. Zytokin-Rezeptor-Expression

Neben der verstärkten Freisetzung von Zytokinen als Immunmediatoren kann die Hochregulation ihrer Rezeptoren auf den Effektorzellen dazu beitragen, daß ein Zytokinsignal verstärkt empfangen wird. Da bisher noch keine Antikörper für Ratten-Zytokinrezeptoren verfügbar sind, mußte die PCR-Analyse der Rezeptor-mRNA Aufschluß über eine Regulation geben.

4.1.6.6.1. TNF- α -Rezeptor-Expression

Das Ausmaß der TNF- α -Rezeptor-mRNA-Transkription wurde 3 Stunden nach LPS-Gabe deutlich verstärkt (Abb. 74). Jedoch wurden bereits ab 6 Stunden nach Injektion wieder Normalwerte erreicht (Abb. 75 und 76).

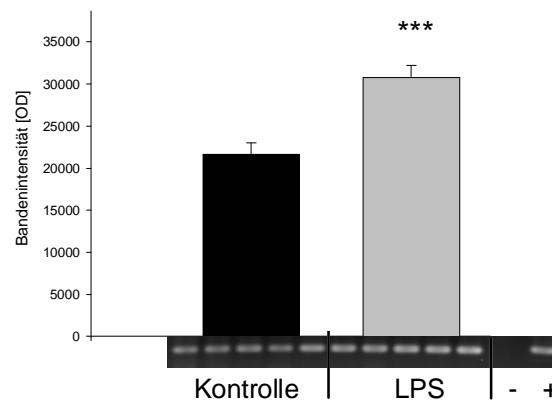


Abb.: 74 TNF- α -Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (35 PCR-Zyklen, ***: $p < 0,001$)

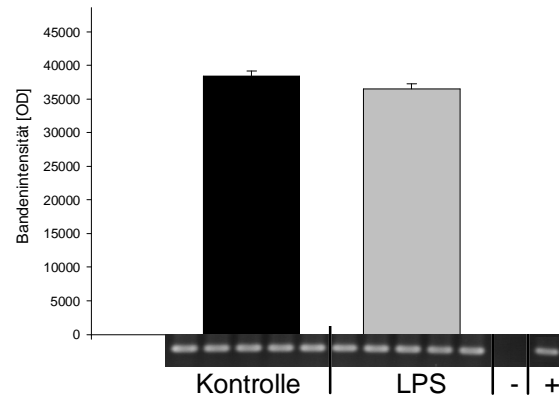


Abb.: 75 TNF- α -Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (35 PCR-Zyklen)

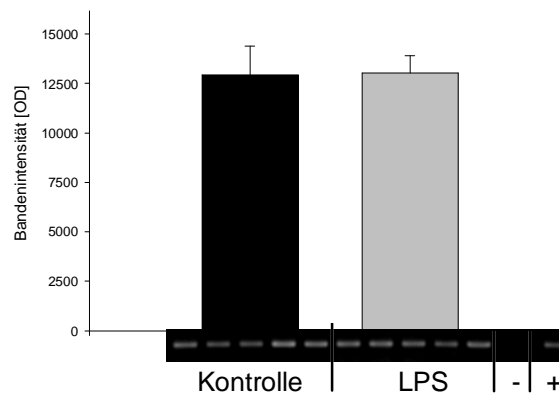


Abb.: 76 TNF- α -Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (35 PCR-Zyklen)

4.1.6.6.2. Interleukin-1 β -Rezeptor-Expression

Die Rezeptor-mRNA des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 β wurde 3 Stunden nach Auslösen eines peripheren, inflammatorischen Stresses durch intraperitonealer LPS-Injektion signifikant verstärkt exprimiert (Abb. 77). Dieser Effekt war jedoch 6 und 24 Stunden nach dem Ereignis nicht mehr zu beobachten (Abb. 78 und 79).

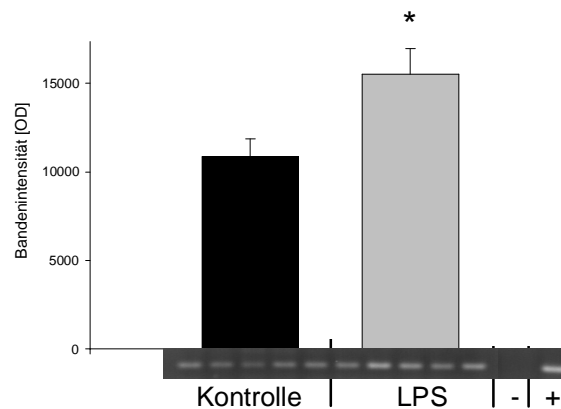


Abb.: 77 Interleukin-1 β -Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (34 PCR-Zyklen, *: $p < 0,05$)

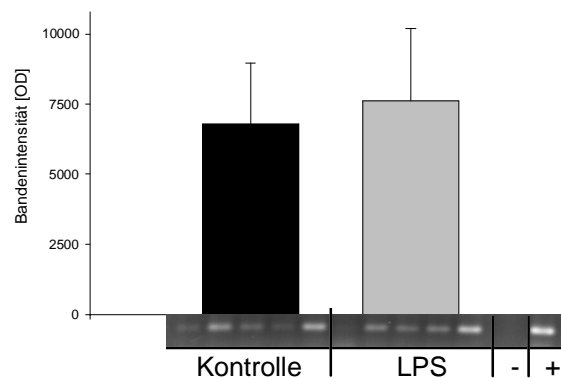


Abb.: 78 Interleukin-1 β -Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (34 PCR-Zyklen)

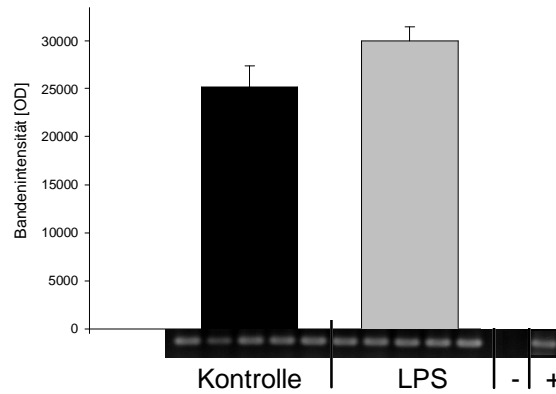


Abb.: 79 Interleukin-1 β -Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (34 PCR-Zyklen)

4.1.6.6.3. Interleukin-6-Rezeptor-Expression

Die Expression des Interleukin-6-Rezeptors unterlag im Hippokampus zu keinem der beobachteten Zeitpunkte nach peripherer LPS-Applikation einer Regulation (Abb. 80 - 82).

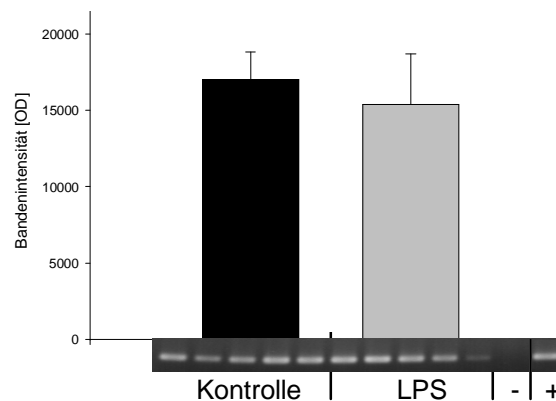


Abb.: 80 Interleukin-6-Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 μ g/kg LPS i.p. (34 PCR-Zyklen)

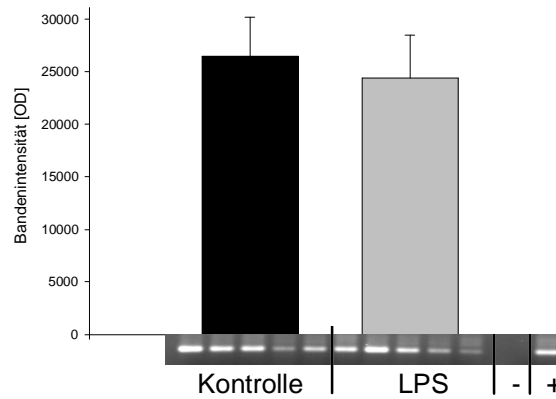


Abb.: 81 Interleukin-6-Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (34 PCR-Zyklen)

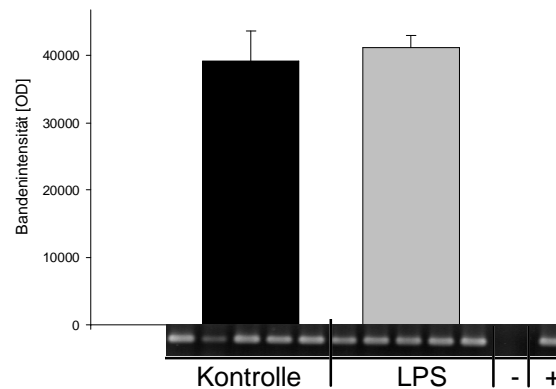


Abb.: 82 Interleukin-6-Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (34 PCR-Zyklen)

4.1.6.6.4. Interleukin-2-Rezeptor-Expression

Die PCR-Analyse der Interleukin-2-Rezeptor-mRNA zeigte 3 Stunden nach LPS-Gabe eine erhebliche Verstärkung der Transkription (Abb. 83). Dieser Effekt war jedoch nach 6 Stunden vollständig aufgehoben und es ergab sich eher der Eindruck einer Gegenregulation (Abb. 84).

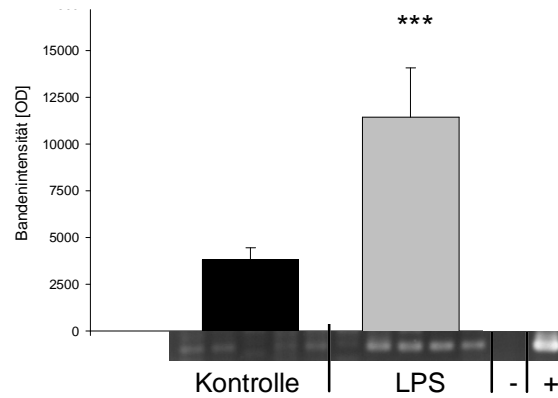


Abb.: 83 Interleukin-2-Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (40 PCR-Zyklen, ***: $p < 0,001$)

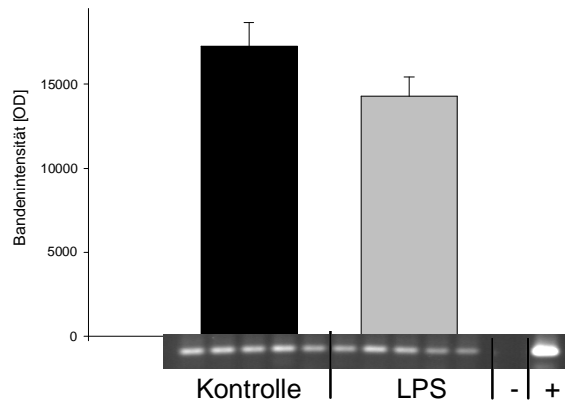


Abb.: 84 Interleukin-2-Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (40 PCR-Zyklen)

Die Aktivierung der IL-2-Rezeptor-mRNA-Synthese war nach 24 Stunden nicht mehr nachzuweisen (Abb. 85).

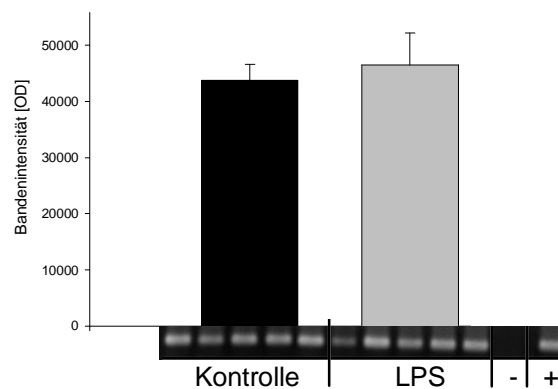


Abb.: 85 Interleukin-2-Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (40 PCR-Zyklen)

4.1.6.6.5. Interleukin-4-Rezeptor-Expression

Die Expression des Interleukin-4-Rezeptors wurde im Hippokampus zu keinem der beobachteten Zeitpunkte auf Transkriptionsebene reguliert (Abb. 86 - 88).

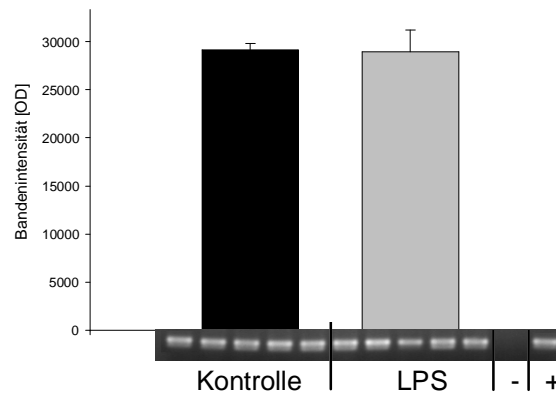


Abb.: 86 Interleukin-4-Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 3 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (34 PCR-Zyklen)

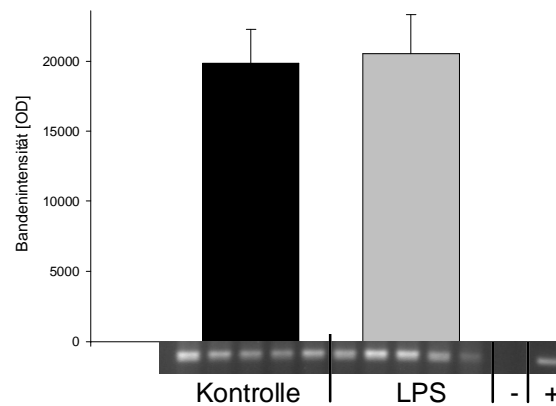


Abb.: 87 Interleukin-4-Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (34 PCR-Zyklen)

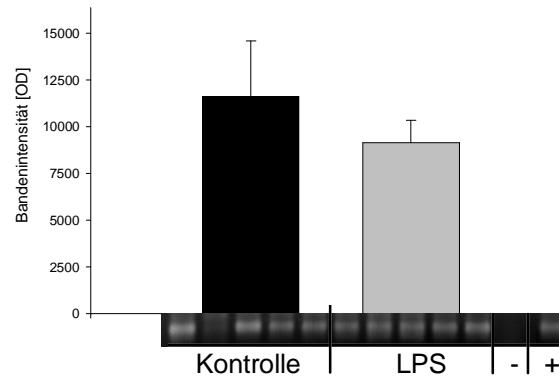


Abb.: 88 Interleukin-4-Rezeptor-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (34 PCR-Zyklen)

4.1.6.7. Nachweis von CD3-mRNA im Hippokampus

Wenn im Fall einer peripheren Entzündung auch im Zentralnervensystem Chemokine exprimiert werden, ist die Invasion von Leukozyten in das neuronale Gewebe jenseits der Blut-Hirn-Schranke zu erwarten. Die Einwanderung von Lymphozyten wurde mittels PCR der CD3-mRNA, eines nur in T-Zellen vorkommenden T-Zell-Rezeptor-Kofaktors untersucht. Da nur relativ wenig Leukozyten in der Hirngewebepräparation zu erwarten waren, mußten relativ viele Zyklen durchgeführt werden bis das PCR-Produkt im Gel visualisiert werden konnte.

3 Stunden nach peripherer LPS-Verabreichung wurde in einer PCR mit 38 Zyklen signifikant mehr CD3-mRNA im Hippokampus nachgewiesen (Abb. 89), ein Befund, welcher eindeutig auf eine Zunahme der T-Zell-Population in diesem Bereich hinweist.

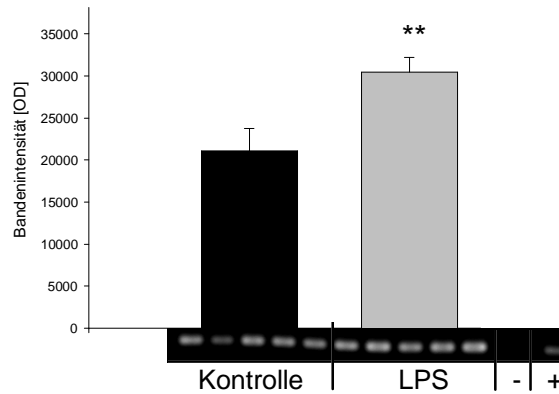


Abb.: 89 Erhöhte CD3-mRNA-Expression im Hippokampus als Marker für eingewanderte T-Zellen 3 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen, **: $p < 0,01$)

6 bzw. 24 Stunden später war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (Abb. 90 und 91). Der Leukozytengehalt des Hippokampus hat demnach wieder den Normalzustand eingenommen.

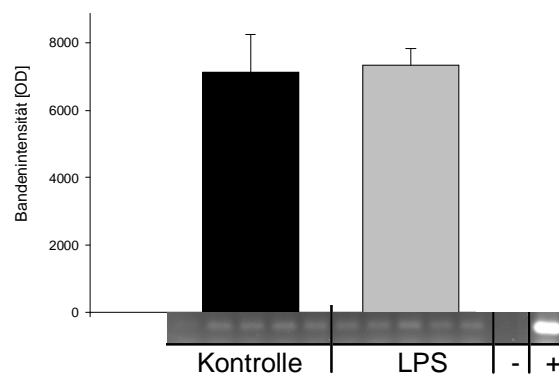


Abb.: 90 CD3-mRNA-Expression im Hippokampus 6 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

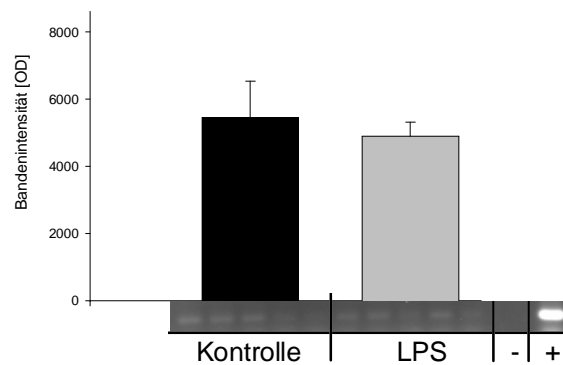


Abb.: 91 CD3-mRNA-Expression im Hippokampus 24 h nach 10 µg/kg LPS i.p. (38 PCR-Zyklen)

4.1.7. Immunhistochemische Identifizierung von Leukozyteninfiltraten im hippokampalen Gewebe

Die vorangegangenen Versuche zeigten, daß Zellen im Hippokampus nach peripherem LPS-Stimulus Zytokine und Chemokine exprimierten. Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen sollte anschließend die Frage geklärt werden, ob auf den chemotaktischen Stimulus aktivierte Leukozyten aus der Peripherie in das ZNS eingewandern und dort an der Zytokinfreisetzung beteiligt sind. Entsprechend den Befunden einer signifikant erhöhten TNF- α - und IL-1 β -Expression im Hippokampus, könnten im Blutgefäß verbliebene Monozyten und in das Parenchym eingewanderte Monozyten bzw Makrophagen dafür verantwortlich sein. Die nachgewiesene erhöhte CD3-mRNA-Expression wiederum deutete auf Beteiligung von T-Zellen hin.

4.1.7.1. Intravaskuläre Monozyten und perivaskuläre Makrophagen

Die immunhistochemische Anfärbung eines unstimulierten Hippokampus mit dem Monozyten bzw. Makrophagen spezifischen Antikörper ED-1 (anti-CD68) zeigte deutlich einige, nach dem Ausbluten des Tieres im Gefäß verbliebene, intravaskuläre Monozyten (Abb. 92). Mit dieser Methode konnten ebenfalls perivaskuläre Makrophagen identifiziert werden, welche aus dem Gefäß in das angrenzende Parenchym ausgewandert sind und dort in engem Kontakt mit dem Gefäßendothel stehen (Abb. 93).

Intravaskuläre Monozyten und perivaskuläre Makrophagen könnten für die in der PCR nachgewiesene basale Zytokinexpression der Hippokampi mit verantwortlich gewesen sein.

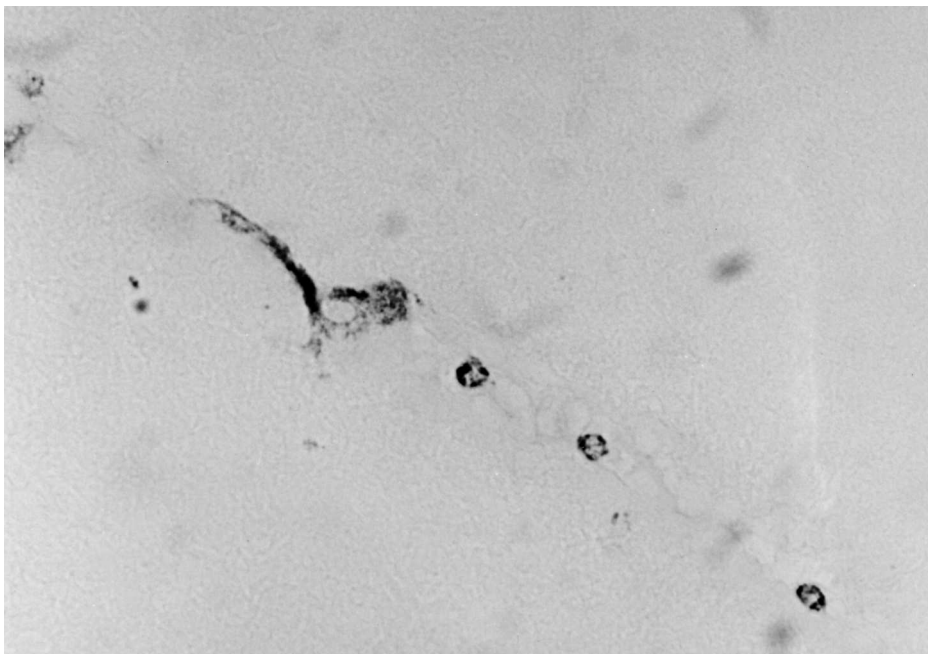


Abb.: 92 ED-1 positive Monozyten in einem Blutgefäß des Hippokampus

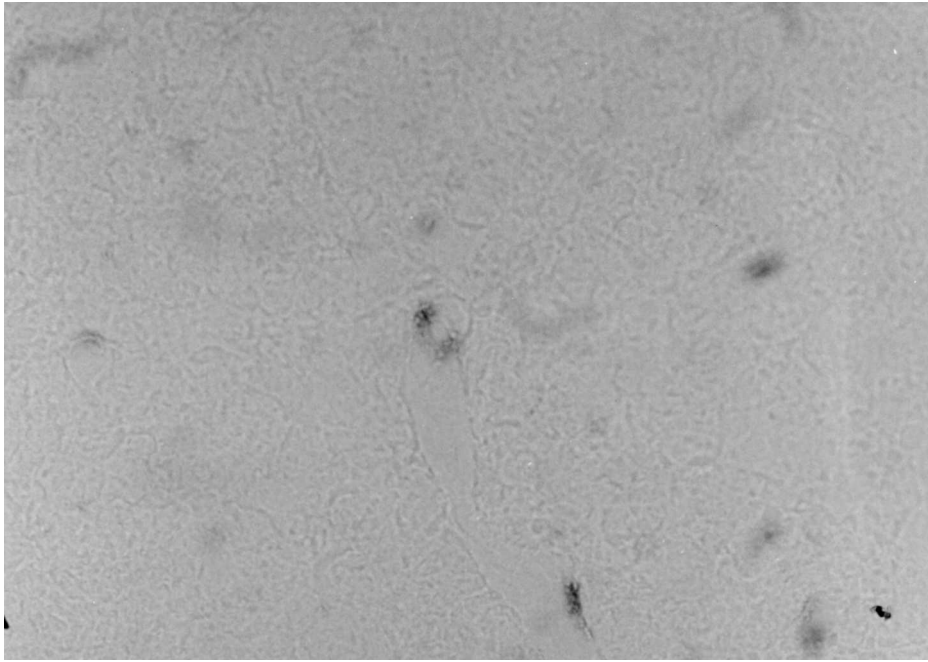


Abb.: 93 ED-1 positive perivaskuläre Makrophagen außerhalb des Blutgefäßes im Parenchym des Hippokampus

4.1.7.2. T-Zellen im Hirnparenchym

Mit einem, gegen den α/β -T-Zell-Rezeptor gerichteten Antikörper (R-73) konnten T-Zellen identifiziert werden, die in den Hippokampi unbehandelter Kontrolltiere aus den Gefäßen in das Parenchym eingewandert waren. Einige T-Zellen hielten noch von außen engen Kontakt mit dem Gefäß (Abb. 94), während andere T-Zellen auch fern der Gefäße im Parenchym lokalisiert werden konnten (Abb. 95). Eine Quantifizierung der eingewanderten Zellen nach der Methode der Immunhistochemie in den Arealen von Kontroll- und LPS-stimulierten-Tieren war wegen der geringen Zahl detektierter Zellen nicht möglich.

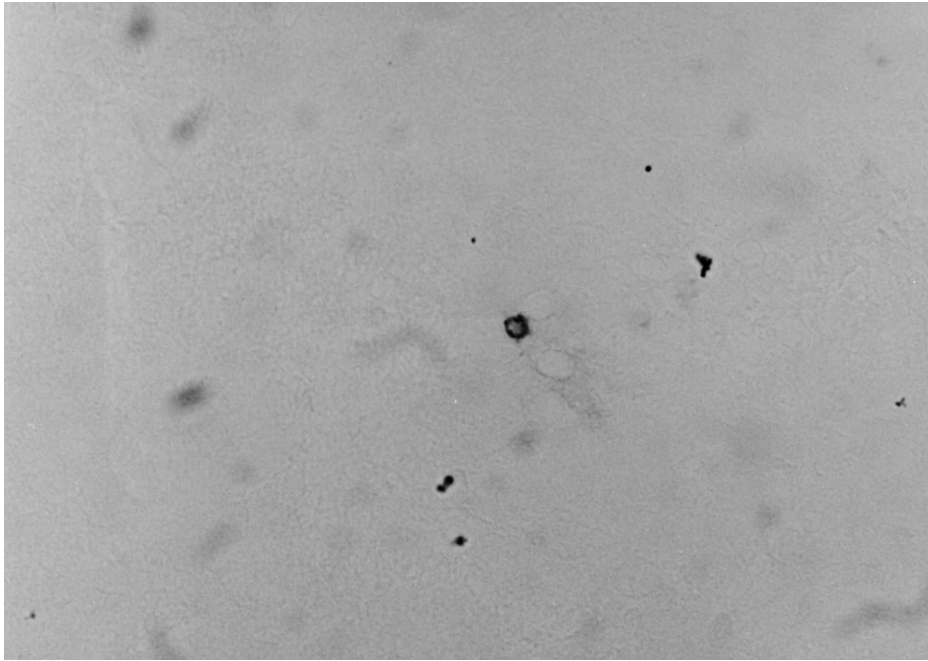


Abb.: 94 R-73 positive, aus dem Blutgefäßes in Parenchym des Hippokampus eingewanderte T-Zelle

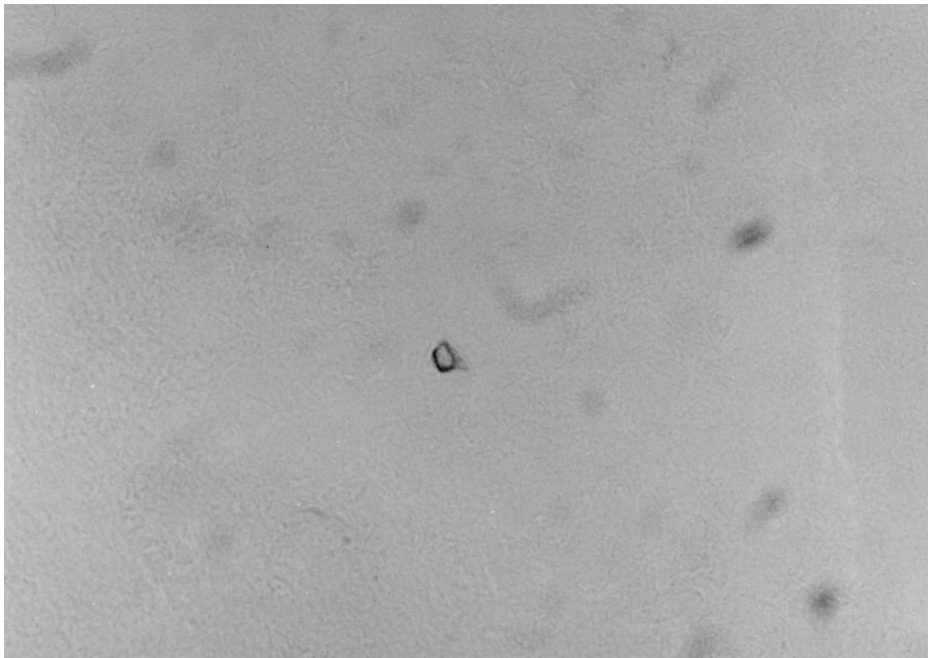


Abb.: 95 R-73 positive T-Zelle im Parenchym des Hippokampus

4.2. Immunsuppressive Mechanismen im Hippokampus nach Immobilisationsstreß

Um herauszufinden, welche der immunsuppressiven Effekte im Hippokampus allein die Folge einer aktivierten HPA-Achse waren, wurde ein 10 min Immobilisationsstreß als psychischer Stressor zur Freisetzung von Glukokortikoiden eingesetzt. Bei diesen Versuchen entfiel also die inflammatorische Komponente des LPS.

4.2.1. Periphere Effekte von Immobilisationsstreß

4.2.1.1. Serum-Kortikosteron nach Immobilisationsstreß

Ratten, die 10 min lang in einer Röhre immobilisiert waren, reagierten sofort mit einem signifikanten Anstieg des Serum-Kortikosterons. Unmittelbar nach Freilassen der Tiere war die Kortikosteronkonzentration des Serums mit 350 ng/ml fast 10 mal höher als in den Kontrolltieren (16ng/ml), die keinem Streß unterzogen worden waren. Diese in der Glukokortikoidkonzentration des Serums sich widerspiegelnde Aktivierung der HPA-Achse hielt noch bis 20 bzw. 50 min nach dem Stressereignis an. 3 Stunden nach Immobilisation waren wieder Serumnormalwerte erreicht (Abb. 96).

Ausgehend von der Beobachtung, daß sich 50 min nach Immobilisationsstreß die HPA-Achse noch aktiviert und nach 3 Stunden wieder in Ruhe befand, wurden im Folgenden diese beiden Zeitpunkte gewählt, um mögliche rein stressinduzierte Expressionseffekte im Hippokampus zu analysieren.

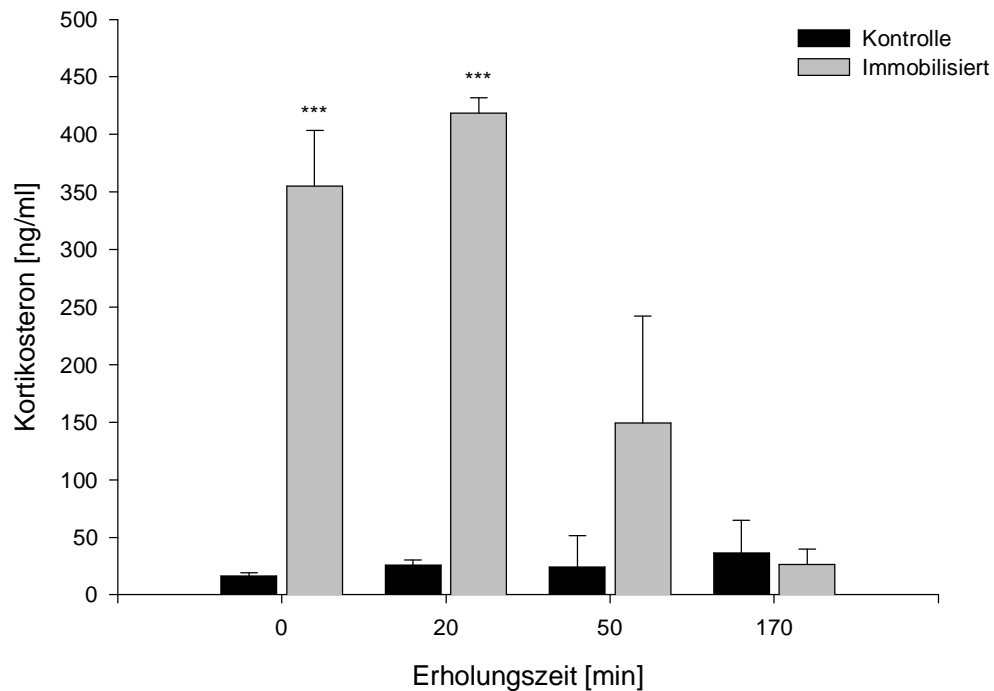


Abb.: 96 Signifikant erhöhtes Serum-Kortikosteron zum Zeitpunkt 0, 20 und 50 min nach 10 min Immobilisationsstreß (N=10, MW±SEM, ***: $p < 0,001$)

4.2.2. Genexpression im hippokampalen Gewebe des ZNS nach Immobilisationsstreß

4.2.2.1. Expression der Kontrollgene

Ausgehend von meinen Ergebnissen, daß die β -Aktin-Expression im Hippokampus nicht konstitutiv erfolgt, sondern leicht induzierbar ist, wurde das Lysozymtranskript zur Kontrolle der mRNA-Präparation herangezogen.

4.2.2.1.1. Lysozym-Expression

Die Auswertung der Lysozym-RT-PCR bestätigte mit gleichen Mengen Transkript in den Kontroll- und Streßgruppen die gleichartige Behandlung aller Proben bei der mRNA-Präparation. Zu keinem Zeitpunkt nach dem Streßereignis waren Unterschiede in der Lysozym-Expression nachweisbar (Abb.: 97 und 98).

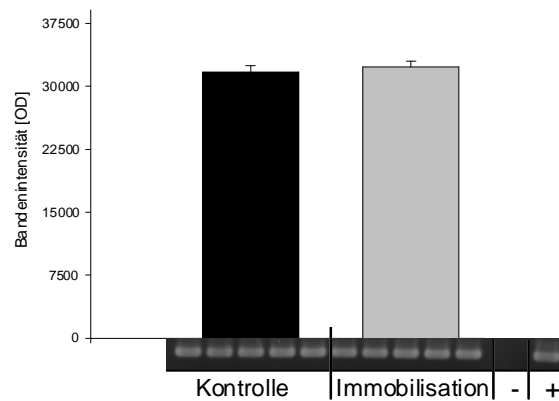


Abb.: 97 Lysozym-mRNA-Expression im Hippokampus 50 min nach Immobilisationsstreß (33 PCR-Zyklen)

Diese gleichmäßige Expression der Lysozym-mRNA bei Kontroll- und Streß-Gruppe zu beiden Zeitpunkten unterstreicht die Brauchbarkeit dieses Transkriptes zur Präparationskontrolle.

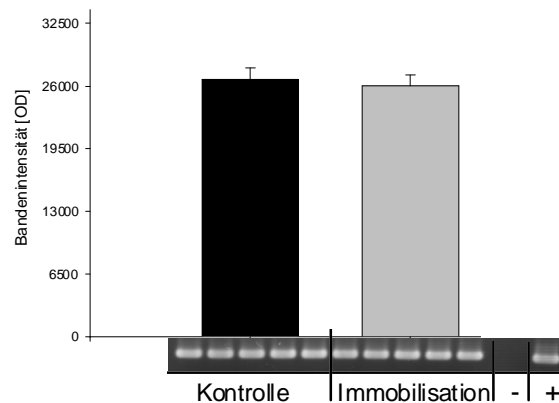


Abb.: 98 Lysozym-mRNA-Expression im Hippokampus 170 min nach Immobilisationsstreß (33 PCR-Zyklen)

4.2.2.1.2. β -Aktin-Expression

50 min nach der Immobilisation war im Hippokampus eine sehr starke, signifikante Zunahme der β -Aktin-mRNA nachweisbar (Abb. 99).

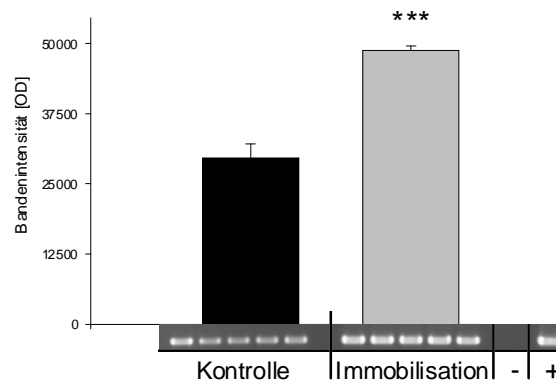


Abb.: 99 Induzierte β -Aktin-mRNA-Expression im Hippokampus 50 min nach Immobilisationsstreß (33 PCR-Zyklen, ***: p<0,001)

Diese Effekt war auch 3 Stunden nach dem Streßereignis noch deutlich sichtbar (Abb. 100).

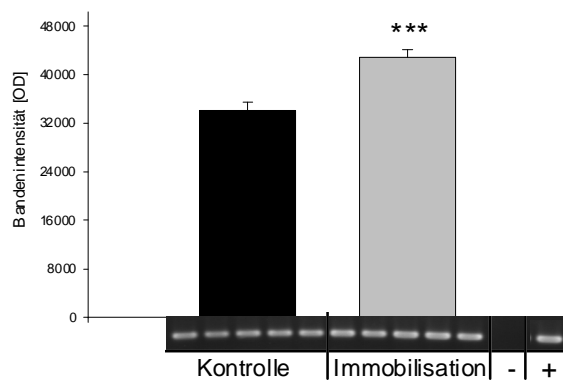


Abb.: 100 Anhaltend gesteigerte β -Aktin-mRNA-Expression im Hippokampus 170 min nach Immobilisationsstreß (33 PCR-Zyklen, ***: p<0,001)

4.2.2.2. Expression von Faktoren des NF- κ B/I- κ B-Systems

4.2.2.2.1. Expression von NF- κ B

Der für die Zytokinexpression mitverantwortliche Transkriptionsfaktor NF- κ B wies 50 und 170 min nach Immobilisationsstreß eine gleichmäßige, also unregulierte Expression auf (Abb.: 101 - 102).

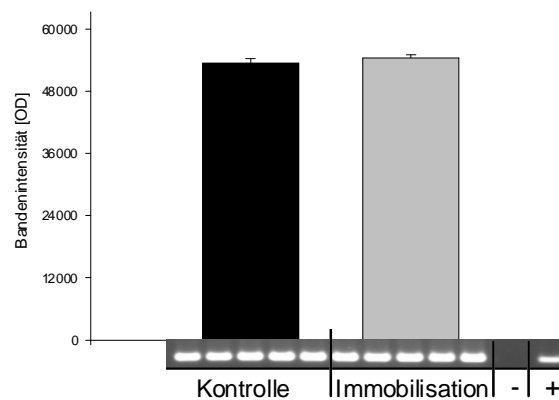


Abb.: 101 NF- κ B-mRNA-Expression im Hippokampus 50 min nach Immobilisationsstreß (N=5, MW \pm SEM, 33 PCR-Zyklen)

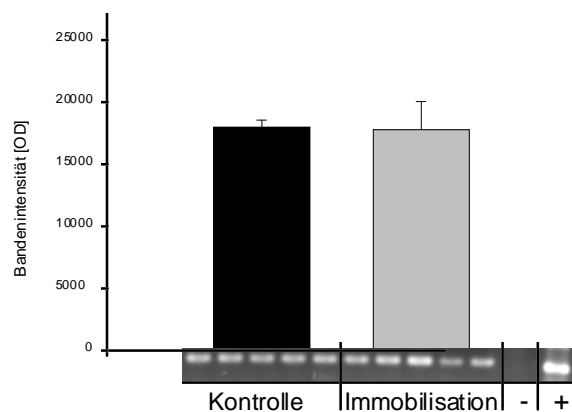


Abb.: 102 NF- κ B-mRNA-Expression im Hippokampus 170 min nach Immobilisationsstreß (N=5, MW \pm SEM, 33 PCR-Zyklen)

4.2.2.2. Expression von I- κ B

Die mRNA-Expression des NF- κ B-Inhibitors I- κ B war 50 min nach Immobilisationsstreß im Hippokampus signifikant erhöht (Abb.: 103). Nach weiteren 2 Stunden war die Hochregulation der I- κ B-mRNA nicht mehr so deutlich ausgeprägt (Abb.: 104)

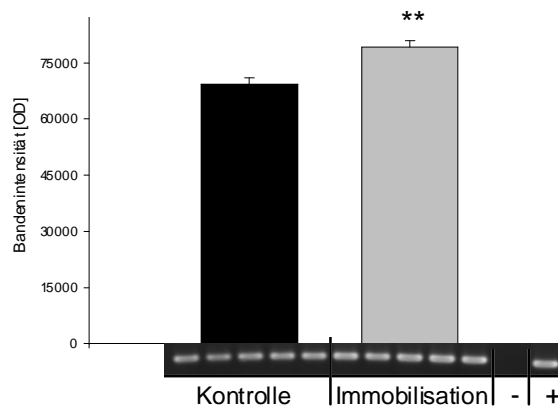


Abb.: 103 I- κ B-mRNA-Expression im Hippokampus 50 min nach Immobilisationsstreß (33 PCR-Zyklen, **: $p < 0,01$)

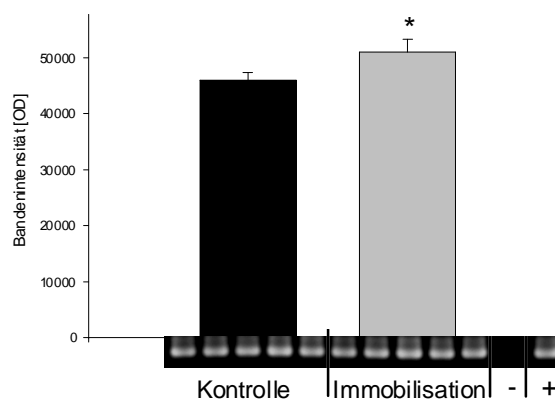


Abb.: 104 I- κ B-mRNA-Expression im Hippokampus 170 min nach Immobilisationsstreß (33 PCR-Zyklen, *: $p < 0,05$)

4.2.2.3. Expression des Mineralkortikoidrezeptors (MCR)

Während beim inflammatorischen Streß eine Induktion der Mineralkortikoidrezeptorexpression zu beobachten war (Abb. 42-44), fand sich nach Immobilisationsstreß eine signifikante Reduktion der MCR-mRNA im hippokampalen Gewebe (Abb. 105 und 106) In diesem Befund zeigte sich deutlich ein Unterschied zwischen einem inflammatorischen und psychischen Stressor.

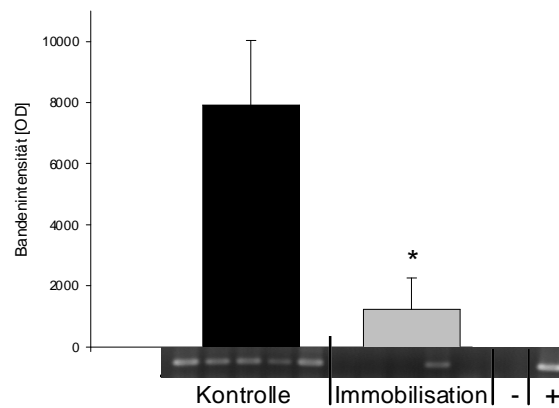


Abb.: 105 MCR-mRNA-Expression im Hippokampus 50 min nach Immobilisationsstreß (33 PCR-Zyklen, *: $p < 0,05$)

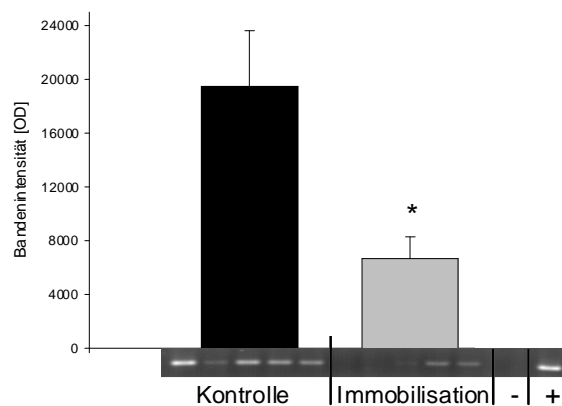


Abb.: 106 MCR-mRNA-Expression im Hippokampus 170 min nach Immobilisationsstreß (33 PCR-Zyklen, *: $p < 0,05$)

5. Diskussion

Nach neueren Untersuchungen findet bei Entzündungen in der Peripherie, die mit der Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Zytokinen) und der Aktivierung immunkompetenter Zellen einhergehen, auch im Zentralnervensystem eine immunologische Reaktion statt. Trotz einer als nahezu unüberwindbar angesehenen Blut-Hirn-Schranke gibt es deutliche Anzeichen dafür, daß eine Zytokinproduktion durch die im Gehirn ansässigen bzw. auf einen Stimulus hin eingewanderten Zellen erfolgt.

Bedingt durch Limitationen der Nachweistchnik war es bisher nur sehr eingeschränkt möglich, die mögliche Rolle von Zytokinen im Zentralnervensystem zu beschreiben. Durch den Fortschritt der letzten Jahre auf molekularbiologischer Ebene (beispielsweise durch Entwicklung der PCR) können jetzt wesentlich aufschlußreicher zumindest die Transkripte von Zytokinen im Gehirn bei Entzündungsreaktionen studiert werden.

Bei einer Reihe vorangegangener Studien wurde der Stimulus LPS im Entzündungsmodell der Ratte mit relativ hohen Dosen (100 - 400 µg/kg) eingesetzt. Diese hohen Dosen sind durchaus nicht physiologisch und bewegen sich an der Grenze zum septischen Schock.

In dieser Situation nahezu unkontrollierbarer, überschießender Immunantwort sind physiologische Regelmechanismen des endokrinen Systems weitgehend außer Kraft gesetzt und nicht selten endet der Versuch mit dem Tod des Versuchstiers. Gerade bei der Applikation hoher LPS-Dosen kann davon ausgegangen werden, daß die Blut-Hirnschranke nicht mehr intakt bleibt. Daher ist die Verwertbarkeit der Versuchsergebnisse für das Studium der Reaktionen des Zentralnervensystems in diesem Modell sehr zweifelhaft, insbesondere dann, wenn sie Aufschluß über eine Beteiligung des Gehirns bei einer „normalen“, kontrollierten Immunantwort der Peripherie geben sollen.

Im Gegensatz dazu sollte in der vorliegenden Arbeit mit einer niedrig dosierten („low-dose“) LPS-Applikation ein Entzündungsvorgang simuliert werden, der einem häufiger eintretenden, nicht letalen Ereignis entspricht. Hierbei können die Effekte in der Peripherie und im Zentralnervensystem in biologisch relevanter Weise studiert werden.

5.1. Pyrogene Effekte peripherer LPS-Applikation

Die in Abbildung 16 gezeigte, moderate Temperaturerhöhung mit einem Gipfel von $\Delta t = 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 3 Stunden nach LPS-Injektion ist vermutlich auf die geringe LPS-Dosis und die rasch eintretenden gegenregulatorischen Mechanismen zurückzuführen. Miller et al. konnten mit der 10-fachen LPS-Dosis ($100\text{ }\mu\text{g/kg}$) ebenfalls einen Fieberhöhepunkt nach 3 Stunden, jedoch mit einer Temperaturdifferenz von $\Delta t = 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ feststellen. Mit systemischer(i.p.) und zentraler (i.c.v.) Applikation von IL-1 β -Rezeptor-Antagonist ließ sich das Fieber signifikant reduzieren (Miller et al., 1997), was einen deutlichen Hinweis auf die Bedeutung von peripher freigesetztem IL-1 β als endogenem Pyrogen gibt.

Mit der Temperaturerhöhung 3 Stunden nach LPS-Applikation ist eine signifikante Induktion der mRNA von Zykllooxygenase-II im Hippokampus zu beobachten, jenem induzierbaren Enzym, welches für die Synthese von Prostaglandin E_2 (PGE_2) verantwortlich ist und welches direkt an der Fieberentwicklung beteiligt ist. Während bei Endotoxin-induzierten Fieber hauptsächlich in die Temperaturregelung des Hypothalamus eingegriffen wird und der Hypokampus eher eine Rolle bei der stressinduzierten Temperaturerhöhung spielt (Morrow et al., 1996), wird PGE_2 anscheinend arealunspezifisch im gesamten ZNS jenseits der Blut-Hirn-Schranke produziert. Als Syntheseorte von PGE_2 mittels der membranständigen Zykllooxygenase-II kommt nach Elmquist die perivaskuläre Mikroglia, welche sich entlang der Blutgefäße zieht, in Frage. Von dort könnte PGE_2 frei durch das ZNS zu mehr oder weniger PGE_2 -sensiblen Arealen diffundieren, um dort

verschiedene Effekte wie Thermoregulation und Schlafinduktion im präoptischen Areal, HPA-Achsen-Aktivierung in der Medulla oder Kopfschmerz im Kortex auszulösen (Elmqvist et al., 1997). Noch nicht umfassend geklärt ist, ob LPS zunächst über die Stimulierung von Endothelzellen des Blutgefäßes auf perivaskuläre Makrophagen bzw. Mikroglia wirken kann oder ob es zu einem direkten LPS-Kontakt der Zellen jenseits der Blut-Hirn-Schranke kommt.

Die Beobachtung, daß 1 Stunde nach Injektion zunächst keine Temperatureffekte zu verzeichnen waren, bevor es über eine kurze Temperatursenkung nach 2½ bis 3 Stunden zur maximalen Temperaturerhöhung mit anschließender Plateauphase (Abb. 16) kam, steht im Einklang mit Ergebnissen von Cao, welcher Zykllooxygenase-II ebenfalls in Blutgefäßnähe lokalisierte (Cao et al., 1995). Das Phänomen des erneuten, aber geringen Temperaturanstieges 8 Stunden nach Versuchsbeginns (Abb. 16) trat bei ihm nicht in Erscheinung, da seine Untersuchungen am Ende der Erholungsphase (7 Stunden nach LPS-Injektion) abgeschlossen wurden. Vermutlich ist hierfür die Wiederaufnahme motorischer Aktivitäten nach der fiebrigen Ruhephase verantwortlich.

5.2. Proinflammatorische Zytokine bei Entzündungen in der Peripherie

Drei Stunden nach intraperitonealer Verabreichung des inflammatorischen Stressors LPS zeigten sich in der Peripherie durch die signifikante Abnahme der peripheren Blutleukozyten (Abb. 14) und dem gleichzeitigen Anstieg des Milzgewichtes (Abb. 15) deutliche Anzeichen einer beginnenden Immunantwort. Dieser Effekt ist auf eine Rekrutierung von LPS-aktivierten und damit Adhäsion-exprimierenden Leukozyten zurückzuführen, welche bei der Passage durch die Milz dort am Gefäßendothel adhärent werden. In erster Linie akkumulieren dort Endotoxin-stimulierte polymorphkernige Leukozyten und Monozyten sowie B-Zellen, welche dann später in der Milz zu

Immunoglobulin produzierenden Plasmazellen ausdifferenzieren. Nachdem Versuche von Hawes fehlgeschlagen sind, einen IL-1 β -induzierten Mechanismus bei der Umverteilung von Leukozyten nach Endotoxin-Stimulus nachzuweisen, wird jetzt die Beteiligung von TNF- α diskutiert (Hawes et al., 1993).

Die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit, kurzzeitig in der Peripherie freigesetzten, geringen Mengen an TNF- α können ausgereicht haben, um als endogenes Pyrogen durch Eingriff in die hypothalamische Temperaturkontrolle eine Körpertemperaturerhöhung zu veranlassen. Mit der Beobachtung, daß erhöhte TNF- α -Konzentrationen im Serum nur 30 min bzw. 3 h nach LPS-Gabe nachzuweisen waren und bereits zur 6. Stunde Basalwerte erreicht wurden, kann der Schluß gezogen werden, daß das proinflammatorische Zytokin TNF- α sehr schnell und nur für eine kurze Zeit in größeren, nachweisbaren Mengen in den peripheren Blutstrom freigesetzt wird. Vermutlich ist die maximale Serumkonzentration des Mediators etwa 1½ Stunden nach LPS-Stimulation zu finden, da auch bei diesem Zeitpunkt in der Zellkultur stimulierte Monozyten die maximale TNF- α -Freisetzung zeigten (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Gerns). Danach werden in den Produzentenzellen, in der Peripherie vorwiegend in Monozyten und Makrophagen, Mechanismen zur Inhibition der Proteinsynthese dieses sehr potenten Zytokins in Gang gesetzt.

Hofslis konnte bei humanen Monozyten in Zellkultur schon 20 min nach Gabe eines LPS-Stimulus TNF- α in perinukleären Vesikeln immunhistochemisch nachweisen. Weitere 20 min später wurde die maximale intrazelluläre TNF- α -Dichte erreicht, zeitgleich mit der ersten Freisetzung in das Medium. 90 min nach LPS-Stimulation war dann das erste Membran-assoziierte TNF- α nachweisbar (Hofslis et al., 1989).

Bei einem Vergleich der intravenösen mit der intraperitonealen LPS-Injektion hinsichtlich der TNF- α -Freisetzung in das Serum stellte Asari fest, daß die intraperitoneale Injektion wesentlich wirksamer ist und ein TNF- α -Maximum im Blut schon nach 1½ Stunden zur Folge hat. Als die wichtigsten

Produktionsstellen benennt er den Intraperitonealraum mit den Peritonealmakrophagen und die Kupffer-Zellen der Leber (Asari et al., 1996). Bei Versuchen, den Einfluß kostimulierender Zellen zu berücksichtigen, wurde peripheres Vollblut mit einem LPS-Stimulus versetzt. Über die FACS-Analyse intrazellulär gefärbter Zytokine konnte nur in Monozyten ein maximaler TNF- α -Gehalt nach 2 Stunden und für IL-1 β nach 4 Stunden nachgewiesen werden (de Caestecker et al., 1992).

Wenn davon ausgegangen werden kann, daß nach intraperitonealer LPS-Injektion das Endotoxin recht langsam in das Blut gelangt und seine maximale Konzentration erst 6 Stunden später nachweisbar ist (Yasui et al., 1995), kommen als primär TNF- α -freisetzende Zellen in erster Linie die Peritonealmakrophagen in Frage, gefolgt von Kupffer-Zellen der Leber (Scotte et al., 1996).

Diese Studien untermauern die eigenen Beobachtungen einer sehr frühen und kurzen TNF- α -Antwort in der Peripherie nach Endotoxinstimulus.

Die Beobachtung, nach der freies IL-1 β -Protein nach LPS-Applikation im Serum eher abnahm (Abb. 18), Detergenz-behandeltes Serum jedoch im Gegensatz dazu 3 und 6 Stunden nach Injektion einen erhöhten IL-1 β -Spiegel aufwies (Abb. 19), könnte mit dem gleichzeitigen Auftreten des löslichen IL-1 β -Rezeptors erklärt werden, der das Protein bindet, dessen physiologische Wirkung antagonisiert und im ELISA interferiert. Durch das proteolytische Kappen der extrazellulären IL-1 β -Rezeptoren wird zudem noch die Sensitivität der Zielzelle gegenüber des verbleibenden, frei zirkulierenden IL-1 β s herabgesetzt.

Symons et al. konnten schon 1990 zeigen, daß PHA-aktivierte, humane Monozyten ein IL-1 β -bindendes Protein produzieren, dessen Konzentration im Zellkulturüberstand noch 7 Tage nach der Stimulierung signifikant erhöht blieb. Mit LPS ließ sich jedoch seine Synthese nicht induzieren (Symons et al., 1990).

Auf die IL-1 β -Deaktivierung durch seinen löslichen Rezeptor könnte auch der von Derijk beschriebene Effekt beruhen, daß nach Applikation pyrogener LPS-

Dosen erhöhte IL-1 β -Spiegel im Plasma gemessen wurden, nach Stimulation mit subpyrogenen-Dosen jedoch kein Plasma-IL-1 β nachweisbar war. (Derijk, et al., 1991).

Im Fall des TNF- α spielt vermutlich ein bindendes Protein keine Rolle, da sich mit der Zugabe von Detergenz zum Serum die nachgewiesenen Mengen an TNF- α -Protein nicht änderten.

Der Befund, daß im Serum der LPS-behandelten Tiere weder mit noch ohne Detergenz IL-6 oberhalb der Nachweisgrenze bestimmt werden konnte, läßt vermuten, daß bei niedrigen LPS-Dosen IL-6 entweder nur in nicht nachweisbaren Mengen oder überhaupt nicht produziert wurde. Die untergeordnete Rolle des IL-6 bei der Entstehung von Fieber konnte Dinarello schon 1991 mit einem Befund unterstreichen, wonach in der Katze eine IL-1 β -Applikation (100 ng/ml) Monozyten zu einer 20-30-fachen Steigerung ihrer PGE₂-Produktion stimulierten, während IL-6 mit 0,15-15 μ g/ml auf die Zellen überhaupt keinen Effekt aufwies (Dinarello et al., 1991).

Weiterhin konnte von Bluthé gezeigt werden, daß sich in der Ratte allein mit der intraperitonealen Gabe von IL-1 β -Rezeptor-Antagonist Verhaltensauffälligkeiten nach LPS (250 μ g/kg, i.p.), das sogenannte „sickness behavior“, antagonisieren ließen. Luheshi et al. blockierten mit IL-1 β -Rezeptor-Antagonist (200 μ g/Ratte, i.p.) die pyrogene Wirkung von 100 μ g/kg LPS (i.p.) (Luheshi et al., 1996).

5.3. LPS-induzierte Aktivierung der HPA-Achse

Es ist allgemein bekannt, daß zur Eindämmung einer akuten Entzündungsreaktion und der Immunantwort durch die aktivierte HPA-Achse das immunsuppressive Glukokortikoid Kortikosteron aus der Nebennierenrinde freigesetzt wird.

In den vorliegenden Versuchen konnten während der ersten halben Stunde nach intraperitonealer LPS-Applikation noch keine Änderungen des Serum-

Kortikosterons beobachtet werden. Jedoch fand sich 3 Stunden nach LPS-Stimulus eine signifikante Erhöhung des Kortikosterons im Vergleich zu den Kontrollen, was deutlich zeigt, daß die HPA-Achse aktiviert wurde (Abb. 20). Als primärer Stimulus dieser immunsuppressiven Hormonkaskade, deren Endprodukte die Glukokortikoide der Nebennierenrinde sind, werden $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 vermutet (Eskay et al., 1990), wobei $\text{TNF-}\alpha$ nach Monozytenaktivierung als zeitlich zuerst sezerniertes Zytokin sicherlich den Hauptinduktor darstellt. Dieser ist auch von dem immunsuppressiven Effekt des Kortikosterons zuerst betroffen. Eskay konnte zeigen, daß die Erhöhungen des Serum- $\text{TNF-}\alpha$ nach LPS-Injektion bei hypophysektomierten oder adrenaletomierten Ratten nicht mehr kurzzeitig sind, sondern sich über einen Zeitraum von 6 Stunden halten (Eskay et al., 1990). Als $\text{TNF-}\alpha$ -suppressiven Effekt der Glukokortikoideinwirkung käme zum einen die Reduktion der LPS-Bindungsstelle (CD14) auf Monozyten (Nockher und Scherberich, 1997) und somit eine Desensibilisierung des Monozyten gegenüber LPS in Frage. Zum anderen könnte eine Glukokortikoid-induzierte Aktivierung des $\text{I-}\kappa\text{B}$ -Systems den für die $\text{TNF-}\alpha$ notwendigen Transkriptionsfaktor $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inhibieren.

Da in der vorliegenden Arbeit das Serum-Kortikosteron 6 Stunden nach LPS-Gabe noch deutlich erhöht war, während $\text{TNF-}\alpha$ nicht mehr nachgewiesen werden konnte, und $\text{IL-1}\beta$ durch löslichen Rezeptor inaktiviert blieb, ist davon auszugehen, daß über diesen Zeitraum ein weiterer Stimulus auf den Hypothalamus als Auslösezentrum der HPA-Achsen-Aktivierung einwirkte.

Neben löslichen Mediatoren wie den peripher freigesetzten Zytokinen, welche über Rezeptoren im ZNS pyrogen in das Entzündungsgeschehen eingreifen, sind noch neuronale Signaltransduktionen von der Peripherie zum Zentralnervensystem in Betracht zu ziehen. So könnte neben der recht langen Zytokinproduktion in der Leber ($\text{TNF-}\alpha$ -Produktion bis 6 h nach LPS-Injektion i.p., Scotte et al., 1996) durch andauernde Einwirkung von LPS auf die Kupffer-Zellen (Yasui et al., 1995) als zusätzlicher HPA-Achsen-Aktivator der Vagus in Frage kommen. Die mögliche Beteiligung des Vagus an der „Kommunikation“ zwischen Peripherie und Zentralnervensystem im Falle einer

Immunantwort konnte schon durch eine Reihe von Experimenten belegt werden.

Ausgehend von der Beobachtung Dantzers (Dantzer, 1994), daß peripher freigesetztes IL-1 β die Signalarate der afferenten Bahn des Vaguszweiges der Leber erhöhte und die c-fos Expression im Nukleus Tractus Solitarius, dem Projektionsfeld des Vagusnerves im ZNS, induzierte (Ericsson et al., 1994), gelang LAYÉ et al. mit einer Vagotomie die Suppression LPS-induzierter IL-1 β -mRNA-Expression im Gehirn der Maus (LAYÉ et al. 1995). Weiterhin konnten Bluthé und Bret-Dibat aus der Arbeitsgruppe Dantzers nachweisen, daß im Maus- und Rattenmodell die Symptome des bekannten „sickness behavior“, wie Änderung in der Nahrungsaufnahme und der Schlafgewohnheiten, gleichfalls vagusvermittelten Mechanismen unterliegen (Bluthé et al., 1994; Bret-Dibat et al., 1995). Bei subdiaphragmatisch vagotomierten Ratten hatte eine intraperitoneale Injektion von 1,25 mg/kg LPS keine Auswirkung auf das Sozialverhalten der Tiere, obwohl der Zytokinanstieg im Serum wie der des IL-1 β unbeeinträchtigt blieb (Bluthé et al., 1994). Vagotomierte Ratten zeigen sowohl nach intraperitonealer IL-1 β -Injektion (Kapcala et al., 1996) als auch nach 20 μ g/kg LPS keine ACTH-Freisetzung mehr (Gaykema et al., 1995).

So ist davon auszugehen, daß weniger die Zytokine direkt über ihre spezifischen Rezeptoren im ZNS, als eher der von lokal produzierten und freigesetzten Zytokinen stimulierte Vagus über afferente Bahnen peripheres Entzündungsgeschehen in das ZNS signalisiert und sich mit der Aktivierung der HPA-Achse an der Auslösung endogener Immunsuppression beteiligt. Für eine gesicherte Evidenz dieser Vorstellung werden jedoch noch Befunde erwartet, die eine klare Interaktion von Zytokinen mit dem Vagus belegen.

5.4. Erhöhte β -Aktin-Expression im Hippokampus nach inflammatorischem und Immobilisations-Streß

Die zu Beginn der Studien gemachte Beobachtung, daß peripher appliziertes LPS eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von β -Aktin, einem bisher als konstitutiv exprimiert angesehenen Gen, im Hippokampus zur Folge hat (Abb. 24-26), ist vermutlich nicht eine immunologische Reaktion auf das LPS. Da im Immobilisationsexperiment bei Aktivierung der HPA-Achse ohne Endotoxin ebenfalls eine signifikante β -Aktin-mRNA-Zunahme im Hippokampus zu beobachten war (Abb. 99 und 100), könnte der Effekt eher auf eine erhöhte Feuerungsrate hippokampaler Neurone oder die Einwirkung von Glukokortikoiden zurückzuführen sein.

Ein ähnlicher Befund von Taishi et al. (Taishi et al., 1997), daß die β -Aktin-Expression im Hippokampus und Cortex der Ratte tagsüber signifikant geringer ausfällt als zur Nachtzeit, könnte ebenso mit der neuronalen Aktivität der nachtaktiven Tiere erklärt werden. Bei diesem Befund wäre auch die Rolle von Glukokortikoiden von Wichtigkeit, da unterschiedliche Konzentrationen zur Tag- und Nachtzeit auftreten.

Trifaro diskutierte schon 1992 die Rolle des vorwiegend am Aufbau des Zytoskeletts beteiligten Aktins bei der neurosekretorischen Exozytose (Trifano et al., 1992). In einer Studie von Riley und Bernstein konnte gleichfalls gezeigt werden, daß die zunehmende Aktivität von Neuronen mit einem erhöhten β -Aktin-mRNA-Gehalt dieser Region verbunden ist (Riley und Bernstein, 1996).

Da bei der neuronalen Signaltransduktion Neurotransmitter in Vesikeln verpackt zur Synapse transportiert werden und β -Aktin ein Bestandteil dieser Vesikel darstellt, ist zu vermuten, daß bei zunehmender Aktivität der Neuronen der damit einhergehende erhöhte Vesikelbedarf an eine gesteigerte de-novo-Synthese von β -Aktin gekoppelt ist.

Eine Beteiligung von Glukokortikoiden an der Reorganisation des Aktin-enthaltenden Zytoskelettes ist jedoch nicht auszuschließen, nachdem in einer Kultur von A549-Zellen nach Glukokortikoidgabe eine Erhöhung von

Caldesmon, einem ubiquitären Aktin- und Calmodulin-bindenden Protein, das zusammen mit Tropomyosin die Mikrofilamente stabilisiert (Matsumura und Yamashiro, 1993), nachzuweisen war (Castellino et al., 1995). Weiterführende Experimente mit einer immunhistochemischen Färbung von Aktin in elektrostimulierten Neuronen in vitro könnten die Ursache der erhöhten β -Aktin-Expression klären.

Aufgrund seiner nicht unerheblichen Regulation ist somit eine Verwendung des β -Aktin-Transkriptes als Präparationskontrolle bei der mRNA-Isolation aus Gewebe des ZNS nicht empfehlenswert. Neben der konstitutiv aber etwas schwach exprimierten Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Abb. 21-23) bietet sich dagegen das Transkript des Lysozyms als Normierungsbasis an (Abb. 27-29). Lysozym wird von Monozyten, Makrophagen und der davon abstammenden Mikroglia in ausreichenden Mengen konstitutiv exprimiert (Zucker-Franklin et al., 1987), d.h. bei Aktivierung dieser Zellen bleibt die Expression dieses Transkriptes annähernd unverändert. Außerdem ergibt sich durch die relativ hohe Basalexpression schon bei wenigen Zyklen in der PCR eine ausreichende Produktmenge mit gut auswertbaren Bandenintensitäten. Mit diesen Versuchen konnte ich zum ersten Mal nachweisen, daß die Kontrolle von mRNA-Präparationen aus Gewebe des ZNS mit ähnlichem histologischen Aufbau anhand der Lysozym-Basalexpression vorgenommen werden kann.

5.5. Expression proinflammatorischer Zytokine im ZNS

Nach einer Reihe von Studien gibt es einen sicheren Anhalt zur Annahme, daß die lokale Produktion von Zytokinen im ZNS nach Endotoxin-Stimulus der Peripherie mit für eine Reihe von Verhaltensänderungen mit verantwortlich ist, besonders bei dem von Hart beschriebenen „sickness behaviour“ (Hart, 1988). Diskutiert wird hierbei speziell eine Beteiligung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Schöbitz et al., 1994).

Anzeichen für eine erhöhte Biosynthese proinflammatorischer Zytokine zeigte sich schon durch die verstärkte Expression der Protoonkogene c-fos und c-jun innerhalb der ersten drei Stunden nach peripherer LPS-Applikation (Abb. 36 - 41), Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Dokter, der zeigte, daß Monozyten bereits 30 min nach LPS-Stimulus eine erhöhte c-fos und c-jun mRNA aufwiesen (Dokter et al., 1993). Da c-jun und c-fos zusammen den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden, der für die Transkription einer Reihe von Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β notwendig ist, könnten sie wesentlicher Bestandteil der Zytokininduktion sein.

Zytokin-mRNA	3 Stunden	6 Stunden	24 Stunden
TNF-α	↑	↑	n.r.
IL-1β	↑	↑	n.r.
IL-6	n.r.	↑	n.r.
IL-2	n.d.	n.d.	n.d.
IL-4	n.d.	n.d.	n.d.
TGF-β	n.r.	↓	↓
MIP-1α	↑	↑	↓
RANTES	↑	n.r.	n.r.
MCP-1	n.r.	n.r.	n.r.
Gro-α	↑	↑	n.r.

Tabelle 1: Übersicht der mRNA-Expressionsmuster von Immunmediatoren im Hippokampus 3, 6 und 24 Stunden nach LPS-Injektion (10 μ g/kg i.p.) (↑ / ↓ = signifikant erhöht / erniedrigt, ↑ / ↓ = leicht erhöht / erniedrigt, n.r. = nicht reguliert, n.d. = nicht detektiert)

Nachdem für IL-1 β , IL-6 und TNF- α zwar im Hippokampus eine Zunahme der mRNA-Expression (Tabelle 1), nicht jedoch der Proteine nachzuweisen war, ist anzunehmen, daß nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von Zellen auf den peripheren Endotoxinstimulus reagierte. Die Proteinsekretion dieser wenigen aktivierten Zellen innerhalb des ZNS war vermutlich so gering (Abb.

52), daß sie zusammen mit der Basalproduktion von Zytokinen im Gewebe keine meßbaren Änderungen bewirkte. Eine ausgedehnte, LPS-induzierte Aktivierung von Zellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen, die zwar in vitro zur Zytokinproduktion angeregt werden können, ist deshalb unter in vivo Bedingungen eher unwahrscheinlich.

Nach den Befunden von Hayashi, daß LPS-stimulierte Astrozyten eine erhöhte MCP-1-Produktion aufweisen (Hayashi et al., 1995), und den Ergebnissen von Aloisi nach denen TNF- α - bzw. IL-1 β -stimulierte Astrozyten IL-6 produzieren (Aloisi et al., 1992), im Gegensatz dazu in dieser Arbeit jedoch keine erhöhte mRNA-Expression für MCP-1 und IL-6 gefunden werden konnte, ist davon auszugehen, daß eine Aktivierung von Astrozyten nach peripherer LPS-Applikation nicht stattgefunden hat.

Bei der Betrachtung der Zytokine, welche in dieser Arbeit nach LPS-Stimulierung im Hippokampus signifikant verstärkt exprimiert wurden, fällt auf, daß es sich bei TNF- α , IL-1 β und IL-6 um sogenannte „Monokine“ handelt, also Zytokine monozytären Ursprungs (Abb. 45, 49, 54). T-Zell-Zytokine, wie IL-2 und IL4, konnten mittels PCR selbst bei hohen Zyklenzahlen im Hippokampus nicht nachgewiesen werden (Abb. 57 und 58), obwohl einige Arbeitsgruppen von einer IL-2-Basalexpression im Gehirn der Ratte (Araújo et al., 1989; Lapchak et al., 1991) und Rattenastrozyten in Kultur (Eizenberg et al., 1995) berichtet haben.

Ebenso kann die erhöhte mRNA-Expression von MIP-1 α , RANTES und Gro- α allein auf aktivierte Monozyten bzw. Makrophagen zurückzuführen sein, da für jedes der drei Chemokine eine LPS-induzierbare Produktion in diesen Zellen gefunden worden ist (VanOtteren et al., 1994), die MCP-1-Sekretion jedoch ausbleibt (Leonard et al., 1993; Liebler et al., 1994; Becker et al., 1994).

Auch bei der Betrachtung der Expressionsmuster von Zytokinrezeptoren wird eine Beteiligung makrophagenähnlicher Zellen deutlich. Während TNF- α -, IL1- β - und IL-2-Rezeptoren nach LPS-Stimulus im Hippokampus signifikant verstärkt exprimiert wurden (Abb. 74, 77, 83), findet bei der Expression der IL-4- und IL-6-Rezeptoren keine Veränderung statt. Nach Literaturangaben hatte

LPS-Stimulation in Monozyten die Hochregulation von TNF- α - (Bethea et al., 1997), IL1- β - und IL-2-Rezeptor (Holter, 1987) zur Folge, wobei nachweislich der IL-4- und IL-6-Rezeptor (Schoester et al., 1994) unreguliert blieben.

Gründe für die nachgewiesene Erhöhung der Monokin-mRNA-Konzentration im Hippokampus können sein:

- die Aktivierung von Zellen monozytären Ursprungs, wie z.B. der Mikroglia durch LPS,
- eine LPS-induzierte Monokinproduktion in Endothelzellen,
- eine LPS-induzierte Migration Monokin-produzierender Zellen durch das Gefäßendothel in das Gehirngewebe.

Der immunhistochemische Nachweis des für Makrophagen und Mikroglia spezifischen CD68 auf dem Gefrierschnitt hippokampalen Gewebes (Abb. 92-93) gibt deutliche Hinweise auf die drei potentiellen Zytokinproduzenten mononukleären Ursprungs:

- aktivierte Monozyten des peripheren Vollblutes, die in den Gefäßen des Präparates verblieben sind,
- in das Hirnparenchym eingewanderte perivaskuläre Makrophagen,
- aktivierte Mikroglia.

Die wichtigste Rolle dürften im Hinblick auf eine neuronale Stimulation und damit auf die entzündungsbedingten Änderungen des Verhaltens die perivaskulären Makrophagen spielen. Durch ihre Lokalisation außerhalb des Gefäßes und jenseits der Blut-Hirn-Schranke können die von ihnen freigesetzten Zytokine frei durch das Parenchym diffundieren und somit die Signaltransduktion der Neurone beeinflussen.

Ebenfalls könnte die Expression von Chemokinen durch Einwirkung auf das Gefäßendothel die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und so die Leukozytenmigration regulieren. Die schon im Hippokampuspräparat unstimulierter Kontrolltiere nachgewiesene Chemokin-mRNA (Abb.: 62, 65, 71) läßt vermuten, daß sich dieser Mechanismus nicht erst bei zerebralen oder peripheren Entzündungen abspielt.

Eine nähere Bestimmung, welche der Monokine und Chemokine von der Mikroglia produziert werden, ist nahezu unmöglich, da aktivierte Monozyten, Makrophagen und Mikroglia, bedingt durch ihren gleichen hämatopoetischen Ursprung, bei Endotoxin-Stimulation ein ähnliches Spektrum an Zytokinen synthetisieren. Eine immunhistochemische Differenzierung über die Methode der Doppelfärbung, wobei neben der Zytokinproteinlokalisierung noch ein spezifischer Zelloberflächenmarker Hinweise auf den Zelltyp geben kann, ist jedoch erst dann möglich, wenn ein Protein gefunden wurde, welches die Mikroglia eindeutig von den Monozyten bzw. Makrophagen unterscheidet. Ein derartiger Differenzierungsmarker ist bisher noch bei keiner Spezies gefunden worden.

Den einzigen Hinweis auf ruhende und somit nicht aktivierte Mikroglia könnte das TGF- β -Expressionsmuster geben. Kiefer konnte bei zerebraler Läsionierung mit nachgewiesener Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia eine dreifache Zunahme der TGF- β -mRNA im betroffenen Areal feststellen, wobei die TGF- β -exprimierenden Zellen die typische Morphologie der Mikroglia aufwiesen. In dieser Arbeit wurde jedoch nach peripherer LPS-Stimulation keine Erhöhung, sondern nach 6 Stunden eine Abnahme der TGF- β -Expression gefunden. (Kiefer et al., 1995)

5.6. Effekte von Zytokinen auf Neurotransmittersysteme

Wenn zytokinsezernierende, immunkompetente Zellen sich in der Nähe von Neuronen befinden, so wie es für die Milz (Felten, 1993), die Leber (Terao et al., 1994) und hier in der Arbeit für das ZNS beschrieben wurde, liegt die Vermutung nahe, daß es zu Wechselwirkungen zwischen dem Nerven- und dem Immunsystem kommt.

Effekte von Neurotransmittern wie Adrenalin und Serotonin auf Immunzellen der Peripherie sind schon ausführlich beschrieben worden und sollen deshalb hier nicht erneut diskutiert werden.

Es liegen jedoch nur wenige Erkenntnisse darüber vor, ob freigesetzte Zytokine die in der Nähe befindlichen Neurone über eine synaptische Neurotransmitterfreisetzung zur Reizweiterleitung stimulieren können und so als „Neurotransmitter“ das periphere Immunsystem mit dem ZNS verschalten.

So kann beispielsweise das serotoninerge System, welches an der Regulation wichtiger Funktionen wie dem Schlaf-Wach-Rhythmus (Jouvet, 1969), Körpertemperatur (Myers, 1981), der Nahrungsaufnahme (Breisch et al., 1976) und der motorischen Aktivität (Grahame-Smith und Green, 1974) beteiligt ist und zudem Funktionen bei Infektionen nachweislich verändert (Krueger et al., 1984; Plata-Salaman et al., 1988; Moldawer et al., 1988; Moldofsky et al., 1989), von Zytokinen moduliert werden.

Clement konnte mit der intraventrikulären Injektion von IL-1 α , IL-1 β und TNF- α eine erhöhte 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA)-Freisetzung über 3 Stunden im Nucleus raphe dorsalis (NRD) beobachten (Clement et al., 1997). Da die extrazelluläre 5-HIAA-Konzentration proportional zum freigesetzten Serotonin ist (Cespuglio et al., 1986), kann davon ausgegangen werden, daß diese Zytokine die Feuerungsrate serotoninerger Neurone erhöhten. Bei diesen Experimenten fiel auf, daß sowohl die intraperitoneale Injektion von LPS (10 μ g/kg) als auch die intraventrikuläre Applikation von Interleukin-1 β (500 U) zu einem biphasischem Verlauf der 5-HIAA-Freisetzung führte. Die Ergebnisse decken sich mit Daten von Gemma, nach denen IL-1 β (2,5 ng,

i.c.v) nach 30 min zu einem erhöhten Serotonin-Stoffwechsel in dem präoptischen Areal der Ratte führte (Gemma et al., 1997).

Ein biphasischer Verlauf konnte auch bei der Körpertemperatur nach intraperitonealer LPS-Injektion in der vorliegenden Arbeit und von Kuhnen (1994) beobachtet werden. Eine direkte Beteiligung des serotoninerger Systems bei der IL-1 β vermittelten Fieberinduktion ist daher wahrscheinlich.

Die Beobachtung von Clement (Clement et al., 1997), daß eine intraventrikuläre IL-2-Injektion keinen signifikanten Effekt auf die 5-HIAA-Freisetzung aufwies, macht deutlich, daß dieses T-Zell-Zytokin im Vergleich zu den Monokinen in der intrazerebralen Aktivierung serotoninerger Neuronen nur eine untergeordnete oder überhaupt keine Rolle spielt.

Dies gilt jedoch nicht für dopaminerge, cholinerge und noradrenerge Systeme. So steigert IL-2 in kultivierten mesencephalen Zellen (Alonso et al., 1993) und im Striatum der Ratte (Lapchak, 1992) die Dopamin-Freisetzung und führt im Hypothalamus zur Steigerung des Noradrenalin-Turnovers (Zalcman et al., 1994).

Während von Araujo eine Senkung der Acetylcholin-Freisetzung in hippocampalen Neuronen beschrieben wurde (Araujo et al., 1989), konnte Seto bei einer IL-2-Konzentration von 10^{-13} M eine Steigerung und bei 10^{-9} M eine Inhibition der Acetylcholin-Freisetzung aufzeigen, welche sich zudem noch durch die Blockade des GABA-Rezeptors aufheben ließ (Seto et al., 1997) und damit eine Beteiligung des GABAergen Transmittersystems vermuten läßt.

Arbeiten von Miller und Fahey beschreiben, daß IL-1 β , nicht jedoch IL-6 und TNF- α , in das GABA- und Glutaminerge System regulierend eingreift und somit sowohl die inhibierenden als auch aktivierenden neuronalen Systeme modulieren kann (Miller und Fahey, 1994).

Die bisherigen Arbeiten haben häufig Zytokineffekte im neuronalen Gewebsverband beschrieben, dabei können auch nicht neuronale Zellen, wie beispielsweise Mikroglia eine Mittlerfunktion für Zytokine übernehmen.

Die spezifische Wirkung einzelner Zytokine auf Neurone wäre jedoch erst mit der Charakterisierung spezifischer Zytokinrezeptoren auf neuronalen Zielzellen schlüssig beweisbar.

5.7. Basale T-Zell-Infiltration des hippocampalen Gewebes

Einen deutlichen Hinweis auf eine Zunahme von T-Zellen in der hippocampalen mRNA-Fraktion zeigte die RT-PCR von CD3-mRNA (Abb. 89). Hierbei fiel zum einen die relativ hohe Basalexpression und ihre Zunahme nach LPS-Stimulation auf. Eine Ursache könnte die erhöhte Adhäsion von T-Zellen an das aktivierte Gefäßendothel sein und damit verbunden eine vermehrte Einwanderung von T-Zellen in das Gewebe des Hippokampus. Nach Matsuda führt eine LPS-Stimulation von zerebralen Endothelzellen über ihre verstärkte Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 zu einer erhöhten LFA-1- bzw. VLA-4-vermittelten Lymphozytenadhärenz (Matsuda et al., 1995). Während sich immunhistologisch eine erhöhte Adhäsion nicht belegen ließ, konnten im Hirnparenchym, sowohl von Kontroll- als auch von LPS-behandelten Tieren, T-Zellen außerhalb der Blutgefäße detektiert werden. So kann davon ausgegangen werden, daß schon ohne inflammatorischen Stimulus T-Zellen das Gefäßendothel der Blut-Hirn-Schranke passieren und zwischen den Zellen des Parenchyms das ZNS durchwandern. Dieser Vorgang könnte durch die verstärkte Produktion von auf T-Zellen chemotaktisch wirkenden Chemokinen wie RANTES unterstützt werden. Da IL-2- und IL-4-mRNA im Hippokampus nicht nachweisbar waren, ist zu vermuten, daß es sich hierbei um nichtaktivierte T-Zellen handelt. Die nachgewiesene, verstärkte IL-2-Rezeptor-Expression wie sie bei aktivierten T-Zellen gefunden wird, kann zum Existenzbeweis solcher Zellen nicht herangezogen werden, da sie auch für aktivierte Monozyten (Holter, 1987) und aktivierte Mikroglia (Sawada et al., 1995) beschrieben wurde. Sollte es im Entzündungsmodell der peripheren LPS-Applikation tatsächlich zu einer Aktivierung der Mikroglia kommen, dann ist es möglich, daß es, wie von Cash

und Rott beschrieben wurde, (Cash und Rott, 1994) zu einer Proliferation intrazerebraler, ruhender T-Zellen kommt.

Eine T-Zell-Infiltration des Parenchyms ist bisher an verschiedenen murinen Enzephalitismodellen (Deckert-Schluter et al., 1994) und bei der Multiplen Sklerose (Ozawa et al., 1994) nachgewiesen worden. Über eine basale T-Zell-Migration ohne inflammatorischen Stimulus liegen bisher noch keine Erkenntnisse vor. Weiterhin ungeklärt ist auch noch der Vorgang, der zur Ausschleusung von T-Zellen aus dem Parenchym beiträgt. Als möglicher Mechanismus zur Entfernung immunreaktiver T-Zellen wird auch der programmierte Zelltod (Apoptose) diskutiert (Gold et al., 1996).

5.8. Immunsuppressive Mechanismen im Hippokampus

Um die im Gewebe des ZNS ausgelöste, begleitende Immunantwort auf eine periphere Entzündung nicht in destruktiven Prozessen enden zu lassen, wirken peripher freigesetzte Glukokortikoide allen proinflammatorischen Prozessen, auch im ZNS, durch Inhibition der Zytokinproduktion entgegen.

Mögliche Wirkungsmechanismen der Glukokortikoide sind zum einen die verstärkte Expression des Inhibitors I- κ B, welcher den zur Zytokinexpression notwendigen Transkriptionsfaktor NF- κ B bindet und so dessen Translokation in den Zellkern verhindert (Auphan et al., 1995), zum anderen die Bindung des Glukokortikoid-Rezeptorkomplexes an den Transkriptionsfaktor AP-1 und dadurch Hemmung der AP-1-abhängigen Zytokinexpression (Krane, 1993). Neben der Einflußnahme auf die Zytokinexpression konnte auch die Suppression einiger Zytokinrezeptoren, wie z.B. des IL1- β -Rezeptors, durch Glukokortikoide nachgewiesen werden (Sauer et al., 1996).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Expression von I- κ B im Hippokampus nach LPS induzierter HPA-Achsen-Aktivierung (Abb. 33 und 34) ist wahrscheinlich auf die Einwirkung von Glukokortikoiden zurückzuführen.

Unterstützt wird diese Annahme von dem Befund, daß eine vom Immobilisationsstreß ausgelöste Freisetzung von Kortikosteron ohne Endotoxin (Abb. 92) ebenfalls zur erhöhten I- κ B-mRNA-Expression führte (Abb. 103 und 104).

Vermittelt wird die Einwirkung von Glukokortikoiden auf Zellen über zwei intrazelluläre Rezeptoren, dem Mineralkortikoid-Rezeptor (MCR, Typ-I) und dem Glukokortikoid-Rezeptor (GCR, Typ-II), wobei im Zentralnervensystem der Mineralkortikoid-Rezeptor mit seiner 10-fach höheren Glukokortikoidaffinität als der Glukokortikoid-Rezeptor die größere Rolle spielt.

Im Immobilisationsexperiment dieser Arbeit konnte bei aktivierter HPA-Achse und dadurch erhöhtem Serum-Kortikosteron eine signifikant verminderte MCR-mRNA-Expression 50 und 170 min nach Immobilisation beobachtet werden (Abb. 105 und 106). Einen ähnlichen Befund machte Olsson, der ebenfalls 1½ - 4 Stunden nach akuten Streß eine Reduktion der MCR-Expression fand (Ollson et al., 1997).

Während der LPS-induzierten Kortikosteronfreisetzung kam es jedoch zu einer signifikant verstärkten Expression des Mineralkortikoid-Rezeptors (Abb. 43).

Es scheint, daß bei psychischem Streß die Reduktion des Mineralkortikoid-Rezeptors Bestandteil eines Desensibilisierungsmechanismus ist, um Zellen bei anhaltender Glukokortikoideinwirkung vor ihrer suppressiven Wirkung zu schützen. Im Fall des inflammatorischen Stresses könnte die Induktion des Rezeptors eine gezielte Sensibilisierung der Zelle gegenüber Glukokortikoiden darstellen, damit deren immunsuppressive Wirkung als Gegenregulation zu den proinflammatorischen Prozessen sich effektiver gestalten kann. Ebenfalls denkbar wären Prozesse, die durch eine verstärkte Produktion freier Rezeptoren die permanente Bindung von Glukokortikoiden bei langandauernder Einwirkung kompensieren. Auch hier sind detaillierte Studien nötig, um die unterschiedliche Expression von Glukokortikoid-Rezeptoren bei dem inflammatorischen Stressor LPS einerseits und dem psychischen Stressor Immobilisation andererseits miteinander zu vergleichen.

Weiterführende Experimente zur Lokalisierung der Zytokinproduzenten sind notwendig, um die an der intrazerebralen Immunantwort auf einen peripheren Endotoxinstimulus beteiligten Zellen näher charakterisieren zu können. Da die RT-PCR hippokampaler mRNA nur einen Anhaltspunkt über Effekte auf Transkriptionsebene geben kann, sich mit ihr jedoch nicht Zellsubpopulationen im Gewebsverband untersuchen lassen, sind leider noch keine Aussagen über die anschließende Protein-Biosynthese und -Sekretion möglich. In Frage kämen hierbei Methoden wie in-situ-Hybridisierung, in-situ-PCR und immunhistochemische Färbungen von Gewebsschnitten. Erschwert werden Studien am Modell der Ratte, im Gegensatz zu denen der Maus durch die geringe Anzahl verfügbarer Antikörper und charakterisierter Gen- bzw. Protein-Sequenzen. Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß sowohl eine peripher gesetzte Inflammation als auch eine psychische Streß-Reaktion eine massive Genexpression im ZNS zur Folge hat. Somit konnte sehr deutlich dokumentiert werden, daß eine sehr enge Interaktion von Immunsystem mit dem ZNS existiert.

6. Zusammenfassung

Entzündungen in der Peripherie des Körpers führen neben einer Temperaturerhöhung auch zu Veränderungen im Verhalten und Empfinden. Postuliert wird deshalb eine enge Interaktion zwischen dem Immun- und Zentralnervensystem. Neuere Untersuchungen ergaben bereits erste Hinweise, daß in der Peripherie generierte Immunmediatoren das ZNS und speziell den Hippokampus beeinflussen.

Zur weiteren Analyse derartiger Interaktionen wurde am Modell der Ratte unter Verwendung einer intraperitoneal verabreichten, niedrig dosierten LPS-Gabe ein typischer Entzündungsstreß simuliert. Die Zytokinfreisetzung in der Peripherie wurde mit der Genexpression der Zytokine, ihrer Transkriptionsfaktoren und mit Komponenten der HPA-Achse im Zentralnervensystem korreliert. Zu einer Aktivierung der HPA-Achse ohne LPS-Stimulus wurde das Stressmodell der Immobilisation eingesetzt.

Sowohl bei inflammatorischem als auch bei Immobilisationsstreß fand sich eine deutliche Aktivierung der HPA-Achse mit erhöhtem Serum-Kortikosteron. Die immunsuppressiven Glukokortikoid-Effekte auf hippokampales Gewebe konnten bei beiden Stressmodellen durch Nachweis des verstärkt exprimierten I- κ B bei ansonsten unregulierten NF- κ B belegt werden.

Die Freisetzung von TNF- α und IL-1 β im Serum nach intraperitonealer LPS-Applikation läßt auf eine überwiegend Monozyten-vermittelte Zytokin-Antwort schließen. Darüberhinaus ist eine Beteiligung des Vagus bei der Zytokin-induzierten HPA-Achsen-Aktivierung anzunehmen. Die Versuche ergaben auch, daß im Modell des niedrig dosierten LPS die biologische Wirksamkeit des freigesetzten IL-1 β durch seine Bindung an Trägerproteine herabgesetzt wird.

Die Expression des Gentranskripts β -Aktin, von dem bisher angenommen wurde, es werde konstitutiv exprimiert, zeigte sich sowohl bei inflammatorischem als auch bei Immobilisations-Streß stark erhöht. Eine angestiegene β -Aktin-Expression ist vermutlich auf exozytotische Vorgänge bei erhöhter Neuronenaktivität zurückzuführen.

Deshalb ist eine Verwendung von β -Aktin als Kontrolltranskript bei mRNA-Präparationen aus zerebralem Gewebe wegen seiner deutlichen stressabhängigen Regulation nicht möglich. Zur mRNA-Präparationskontrolle ist das Lysozymtranskript besser geeignet.

Nach LPS-induzierter Entzündungsreaktion fand sich ein markanter Anstieg der Gentranskripte für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β im ZNS. Gleichfalls erhöht waren die mRNAs der Chemokine MIP-1 α , RANTES und Gro- α im Hippokampus. Gerade der letzte Befund zeigt eindeutig, daß durch periphere Entzündung stimulierte Leukozyten einen Zugang zum chemokinproduzierenden ZNS finden können.

Eine Zytokin- und Chemokinexpression größerer Zellverbände wie der von Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten im Hippokampus nach LPS-Stimulation ließ sich nicht nachweisen. Auf Basis der vorliegenden Befunde muß davon ausgegangen werden, daß in das Parenchym eingewanderte monozytäre Zellen peripheren Ursprungs für die erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine verantwortlich sind.

Die vorliegenden Ergebnisse dokumentieren auch, daß T-Zellen schon im Normalfall ohne Endotoxinstimulus die Blut-Hirn-Schranke passieren und durch das Parenchym migrieren.

Der modulierende, wahrscheinlich überwiegend dämpfende Einfluß von Glukokortikoiden auf die Immunantwort im ZNS wird dadurch verdeutlicht, daß der Mineralkortikoid-Rezeptor im Hippokampus bei inflammatorischen Streß hochreguliert wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, daß bei Streß-Reaktionen enge Interaktionen zwischen dem Immunsystem und dem ZNS auftreten. Träger der Signale sind überwiegend Zytokine, Chemokine und die beschriebenen Leukozyten wie Monozyten und Lymphozyten.

7. Literaturverzeichnis

Akerblom, I.E., Slater, E.P., Beato, M., Baxter, J.D., & Mellon, P.L. (1988). Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science*, 241, 350-353.

Akiyama, H., & McGeer, P.L. (1990). Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *J Neuroimmunol*, 30, 81-93.

Alam, R., Forsythe, P.A., Stafford, S., Lett-Brown, M.A., & Grant, J.A. (1992). Macrophage inflammatory protein-1 alpha activates basophils and mast cells. *J Exp Med*, 176, 781-786.

Aloisi, F., Care, A., Borsellino, G., Gallo, P., Rosa, S., Bassani, A., Cabibbo, A., Testa, U., Levi, G., & Peschle, C. (1992). Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 149, 2358-2366.

Alonso, R., Chaudieu, I., Diorio, J., Krishnamurthy, A., Quirion, R., & Boksa, P. (1993). Interleukin-2 modulates evoked release of [3H]dopamine in rat cultured mesencephalic cells. *J Neurochem*, 61, 1284-1290.

Arai, N., Tsuboi, A., Iwai, Y., Miyatake, S., Yokota, K., de Waal Malefyt, R., Muramatsu, M., Matsuda, I., Nishida, J., & Baldwin, D. (1990). Regulation of IL-3, IL-4 and GM-CSF genes and signal transduction by their receptors. *Lymphokine Res*, 9, 551-553.

Araujo, D.M., Lapchak, P.A., Collier, B., & Quirion, R. (1989). Localization of interleukin-2 immunoreactivity and interleukin-2 receptors in the rat brain: interaction with the cholinergic system. *Brain Res*, 498, 257-266.

Asari, Y., Majima, M., Sugimoto, K., Katori, M., & Ohwada, T. (1996). Release site of TNF alpha after intravenous and intraperitoneal injection of LPS from *Escherichia coli* in rats. *Shock*, 5, 208-212.

Assoian, R.K. (1987). Purification of type-beta transforming growth factor from human platelets. *Methods Enzymol*, 146:153-63, 153-163.

Assoian, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.C., Miller, P.J., Madtes, D.K., Raines, E.W., Ross, R., & Sporn, M.B. (1987). Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 6020-6024.

Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., & Sporn, M.B. (1983). Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*, 258, 7155-7160.

- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A., & Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis [see comments]. *Science*, 270, 286-290.
- Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolff, S.M., & Dinarello, C.A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 7907-7911.
- Bacon, K.B., Flores-Romo, L., Aubry, J.P., Wells, T.N., & Power, C.A. (1994). Interleukin-8 and RANTES induce the adhesion of the human basophilic cell line KU-812 to human endothelial cell monolayers. *Immunology*, 82, 473-481.
- Baggiolini, M., Moser, B., & Clark-Lewis, I. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture. *Chest*, 105, 95S-98S.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14:649-83, 649-683.
- Batuman, O.A., Ferrero, A., Cupp, C., Jimenez, S.A., & Khalili, K. (1995). Differential regulation of transforming growth factor beta-1 gene expression by glucocorticoids in human T and glial cells. *J Immunol*, 155, 4397-4405.
- Becker, S., Quay, J., Koren, H.S., & Haskill, J.S. (1994). Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol*, 266, L278-86.
- Behl, C., Lezoualc'h, F., Trapp, T., Widmann, M., Skutella, T., & Holsboer, F. (1997). Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology*, 138, 101-106.
- Bell, M.D., Taub, D.D., & Perry, V.H. (1996). Overriding the brain's intrinsic resistance to leukocyte recruitment with intraparenchymal injections of recombinant chemokines. *Neuroscience*, 74, 283-292.
- Benveniste, E.N., & Merrill, J.E. (1986). Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by interleukin-2. *Nature*, 321, 610-613.
- Benveniste, E.N., Sparacio, S.M., & Bethea, J.R. (1989). Tumor necrosis factor-alpha enhances interferon-gamma-mediated class II antigen expression on astrocytes. *J Neuroimmunol*, 25, 209-219.
- Benveniste, E.N., Sparacio, S.M., Norris, J.G., Grenett, H.E., & Fuller, G.M. (1990). Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol*, 30, 201-212.

Benveniste, H., Hedlund, L.W., & Johnson, G.A. (1992). Mechanism of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke*, 23, 746-754.

Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., & Dinarello, C.A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*, 233, 652-654.

Bethea, J.R., Ohmori, Y., & Hamilton, T.A. (1997). A tandem GC box motif is necessary for lipopolysaccharide-induced transcription of the type II TNF receptor gene. *J Immunol*, 158, 5815-5823.

Beutler, B., & Cerami, A. (1986). Cachectin/tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunol Res*, 5, 281-293.

Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., & Uyeda, C.T. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res*, 43, 429-435.

Bluthe, R.M., Walter, V., Parnet, P., Laye, S., Lestage, J., Verrier, D., Poole, S., Stenning, B.E., Kelley, K.W., & Dantzer, R. (1994). Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III*, 317, 499-503.

Bohnsack, J.F., Akiyama, S.K., Damsky, C.H., Knape, W.A., & Zimmerman, G.A. (1990). Human neutrophil adherence to laminin in vitro. Evidence for a distinct neutrophil integrin receptor for laminin. *J Exp Med*, 171, 1221-1237.

Breisch, S.T., Zemlan, F.P., & Hoebel, B.G. (1976). Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science*, 192, 382-385.

Bret-Dibat, J.L., Bluthe, R.M., Kent, S., Kelley, K.W., & Dantzer, R. (1995). Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. *Brain Behav Immun*, 9, 242-246.

Brett, J., Gerlach, H., Nawroth, P., Steinberg, S., Godman, G., & Stern, D. (1989). Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med*, 169, 1977-1991.

Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K., & Watanabe, Y. (1995). Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. *Brain Res*, 697, 187-196.

- Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., & Springer, T.A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3652-3656.
- Cash, E., & Rott, O. (1994). Microglial cells qualify as the stimulators of unprimed CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the central nervous system. *Clin Exp Immunol*, 98, 313-318.
- Castellino, F., Ono, S., Matsumura, F., & Luini, A. (1995). Essential role of caldesmon in the actin filament reorganization induced by glucocorticoids. *J Cell Biol*, 131, 1223-1230.
- Cespuglio, R., Sarda, N., Gharib, A., Faradji, H., & Chastrette, N. (1986). Differential pulse voltammetry in vivo with working carbon fiber electrodes: 5-hydroxyindole compounds or uric acid detection? *Exp Brain Res*, 64, 589-595.
- Chung, I.Y., & Benveniste, E.N. (1990). Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol*, 144, 2999-3007.
- Clark, B.D., Collins, K.L., Gandy, M.S., Webb, A.C., & Auron, P.E. (1986). Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene [published erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1987 Jan 26;15(2): 868]. *Nucleic Acids Res*, 14, 7897-7914.
- Clement, H.-W., Hasse, C., Wesemann, W. (1997) Serotonin und Immunfunktion: Einfluß von Zytokinen und Stress. In: Psychoneuroimmunologie - Ein interdisziplinäres Forschungsgebiet. (K.-H. Schulz, H.J. Kugler, M. Schedlowski, eds.) Hubert Verlag, Bern, 274 –282.
- Cuturi, M.C., Murphy, M., Costa-Giomi, M.P., Weinmann, R., Perussia, B., & Trinchieri, G. (1987). Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*, 165, 1581-1594.
- Dantzer, R. (1994). How do cytokines say hello to the brain? Neural versus humoral mediation. *Eur Cytokine Netw*, 5, 271-273.
- de Caestecker, M.P., Telfer, B.A., Hutchinson, I.V., & Ballardie, F.W. (1992). The detection of intracytoplasmic interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumour necrosis factor alpha expression in human monocytes using two colour immunofluorescence flow cytometry. *J Immunol Methods*, 154, 11-20.

Deckert-Schluter, M., Schluter, D., Hof, H., Wiestler, O.D., & Lassmann, H. (1994). Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac- 1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine Toxoplasma encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 53, 457-468.

Derijk, R., Van Rooijen, N., Tilders, F.J., Besedovsky, H.O., del Rey, A., & Berkenbosch, F. (1991). Selective depletion of macrophages prevents pituitary-adrenal activation in response to subpyrogenic, but not to pyrogenic, doses of bacterial endotoxin in rats. *Endocrinology*, 129, 330-338.

di Giovine, F.S., & Duff, G.W. (1990). Interleukin 1: the first interleukin [see comments]. *Immunol Today*, 11, 13-20.

Dinarello, C.A. (1991). The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis*, 163, 1177-1184.

Dinarello, C.A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 77, 1627-1652.

Dinarello, C.A. (1991). Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol*, 3, 941-948.

Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Mancilla, J., Bishai, I., Lees, J., & Coceani, F. (1991). Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res*, 562, 199-206.

Dinarello, C.A., & Thompson, R.C. (1991). Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today*, 12, 404-410.

Dokter, W.H., Esselink, M.T., Halie, M.R., & Vellenga, E. (1993). Interleukin-4 inhibits the lipopolysaccharide-induced expression of c- jun and c-fos messenger RNA and activator protein-1 binding activity in human monocytes. *Blood*, 81, 337-343.

Eddleston, M., de La Torre, J.C., Xu, J.Y., Dorfman, N., Notkins, A., Zolla-Pazner, S., & Oldstone, M.B. (1993). Molecular mimicry accompanying HIV-1 infection: human monoclonal antibodies that bind to gp41 and to astrocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 9, 939-944.

Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Lotan, M., & Schwartz, M. (1995). Interleukin-2 transcripts in human and rodent brains: possible expression by astrocytes. *J Neurochem*, 64, 1928-1936.

Elmqvist, J.K., Breder, C.D., Sherin, J.E., Scammell, T.E., Hickey, W.F., Dewitt, D., & Saper, C.B. (1997). Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol*, 381, 119-129.

Ericsson, A., Kovacs, K.J., & Sawchenko, P.E. (1994). A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci*, 14, 897-913.

Eskay, R.L., Grino, M., & Chen, H.T. (1990). Interleukins, signal transduction, and the immune system-mediated stress response. *Adv Exp Med Biol*, 274:331-43, 331-343.

Fabry, Z., Topham, D.J., Fee, D., Herlein, J., Carlino, J.A., Hart, M.N., & Sriram, S. (1995). TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. *J Immunol*, 155, 325-332.

Felten, D.L. (1993). Direct innervation of lymphoid organs: substrate for neurotransmitter signaling of cells of the immune system. *Neuropsychobiology*, 28, 110-112.

Frei, K., Malipiero, U.V., Leist, T.P., Zinkernagel, R.M., Schwab, M.E., & Fontana, A. (1989). On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol*, 19, 689-694.

Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwerdel, C., & Fontana, A. (1987). Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol*, 17, 1271-1278.

Frohman, E.M., Frohman, T.C., Dustin, M.L., Vayuvegula, B., Choi, B., Gupta, A., van den Noort, S., & Gupta, S. (1989). The induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin, and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J Neuroimmunol*, 23, 117-124.

Gaykema, R.P., Dijkstra, I., & Tilders, F.J. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. *Endocrinology*, 136, 4717-4720.

Gemma, C., Imeri, L., de Simoni, M.G., & Mancina, M. (1997). Interleukin-1 induces changes in sleep, brain temperature, and serotonergic metabolism. *Am J Physiol*, 272, R601-6.

Gifford, G.E., & Flick, D.A. (1987). Natural production and release of tumour necrosis factor. *Ciba Found Symp*, 131:3-20, 3-20.

Gifford, G.E., & Lohmann-Matthes, M.L. (1987). Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. *J Natl Cancer Inst*, 78, 121-124.

Giri, J.G., Newton, R.C., & Horuk, R. (1990). Identification of soluble interleukin-1 binding protein in cell-free supernatants. Evidence for soluble interleukin-1 receptor. *J Biol Chem*, 265, 17416-17419.

Giulian, D., & Baker, T.J. (1986). Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*, 6, 2163-2178.

Giulian, D., Baker, T.J., Shih, L.C., & Lachman, L.B. (1986). Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med*, 164, 594-604.

Glabinski, A.R., Balasingam, V., Tani, M., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Yong, V.W., & Ransohoff, R.M. (1996). Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J Immunol*, 156, 4363-4368.

Gold, R., Schmied, M., Tontsch, U., Hartung, H.P., Wekerle, H., Toyka, K.V., & Lassmann, H. (1996). Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes for apoptotic cell death. A model for T-cell apoptosis in vivo. *Brain*, 119, 651-659.

Gourmala, N.G., Buttini, M., Limonta, S., Sauter, A., & Boddeke, H.W. (1997). Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol*, 74, 35-44.

Grahame-Smith, D.G., & Green, A.R. (1974). The role of brain 5-hydroxytryptamine in the hyperactivity produced in rats by lithium and monoamine oxidase inhibition. *Br J Pharmacol*, 52, 19-26.

Graves, D.T., & Jiang, Y. (1995). Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med*, 6, 109-118.

Grove, M., & Plumb, M. (1993). C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. *Mol Cell Biol*, 13, 5276-5289.

Gurvits, T.V., Shenton, M.E., Hokama, H., Ohta, H., Lasko, N.B., Gilbertson, M.W., Orr, S.P., Kikinis, R., Jolesz, F.A., McCarley, R.W., & Pitman, R.K. (1996). Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 40, 1091-1099.

Hart, E.E., Williams, C.L., & Davidson, J.A. (1988). Suicidal behaviour, social networks and psychiatric diagnosis. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 23, 222-228.

Hawes, A.S., Fischer, E., Marano, M.A., Van Zee, K.J., Rock, C.S., Lowry, S.F., Calvano, S.E., & Moldawer, L.L. (1993). Comparison of peripheral blood leukocyte kinetics after live *Escherichia coli*, endotoxin, or interleukin-1 alpha administration. Studies using a novel interleukin-1 receptor antagonist. *Ann Surg*, 218, 79-90.

Hayashi, M., Luo, Y., Laning, J., Strieter, R.M., & Dorf, M.E. (1995). Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines in murine glial cells. *J Neuroimmunol*, 60, 143-150.

Hertz, L., Schousboe, A., Boechler, N., Mukerji, S., & Fedoroff, S. (1978). Kinetic characteristics of the glutamate uptake into normal astrocytes in cultures. *Neurochem Res*, 3, 1-14.

Hickey, W.F., & Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*, 239, 290-292.

Hirano, S. (1996). Migratory responses of PMN after intraperitoneal and intratracheal administration of lipopolysaccharide. *Am J Physiol*, 270, L836-45.

Hofsli, E., Bakke, O., Nonstad, U., & Espevik, T. (1989). A flow cytometric and immunofluorescence microscopic study of tumor necrosis factor production and localization in human monocytes. *Cell Immunol*, 122, 405-415.

Holter, W., Goldman, C.K., Casabo, L., Nelson, D.L., Greene, W.C., & Waldmann, T.A. (1987). Expression of functional IL 2 receptors by lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulated human monocytes. *J Immunol*, 138, 2917-2922.

Horel, J.A., & Misantone, L.J. (1974). The Kluver-Bucy syndrome produced by partial isolation of the temporal lobe. *Exp Neurol*, 42, 101-112.

Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F., 3d, & Weiss, S.J. (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8 [published errata appear in *Science* 1991 Nov 1;254(5032):631 and 1991 Dec 6;254(5037):1435]. *Science*, 254, 99-102.

Ignatz, R.A., & Massague, J. (1987). Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell*, 51, 189-197.

Janzer, R.C., & Raff, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325, 253-257.

Jiang, H., Milo, R., Swoveland, P., Johnson, K.P., Panitch, H., & Dhib-Jalbut, S. (1995). Interferon beta-1b reduces interferon gamma-induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. *J Neuroimmunol*, 61, 17-25.

Jiang, Y., Beller, D.I., Frendl, G., & Graves, D.T. (1992). Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*, 148, 2423-2428.

Jiang, Y., Tabak, L.A., Valente, A.J., & Graves, D.T. (1991). Initial characterization of the carbohydrate structure of MCP-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 178, 1400-1404.

Jirik, F.R., Podor, T.J., Hirano, T., Kishimoto, T., Loskutoff, D.J., Carson, D.A., & Lotz, M. (1989). Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*, 142, 144-147.

Jouvet, M. (1969). Biogenic amines and the states of sleep. *Science*, 163, 32-41.

Kameyoshi, Y., Schroder, J.M., Christophers, E., & Yamamoto, S. (1994). Identification of the cytokine RANTES released from platelets as an eosinophil chemotactic factor. *Int Arch Allergy Immunol*, 104 Suppl 1, 49-51.

Kapcala, L.P., He, J.R., Gao, Y., Pieper, J.O., & DeTolla, L.J. (1996). Subdiaphragmatic vagotomy inhibits intra-abdominal interleukin-1 beta stimulation of adrenocorticotropin secretion. *Brain Res*, 728, 247-254.

Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., & Fauci, A.S. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med*, 163, 1037-1050.

Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., & Schall, T.J. (1994). Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 266, 1395-1399.

Kiefer, R., Streit, W.J., Toyka, K.V., Kreutzberg, G.W., & Hartung, H.P. (1995). Transforming growth factor-beta 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system. *Int J Dev Neurosci*, 13, 331-339.

Kitamura, M., Suto, T., Yokoo, T., Shimizu, F., & Fine, L.G. (1996). Transforming growth factor-beta 1 is the predominant paracrine inhibitor of macrophage cytokine synthesis produced by glomerular mesangial cells. *J Immunol*, 156, 2964-2971.

Klir, J.J., Roth, J., Szelenyi, Z., McClellan, J.L., & Kluger, M.J. (1993). Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat. *Am J Physiol*, 265, R512-7.

Knudsen, P.J., Dinarello, C.A., & Strom, T.B. (1987). Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J Immunol*, 139, 4129-4134.

Krane, S.M. (1993). Some molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Br J Rheumatol*, 32 Suppl 2:3-5, 3-5.

Krueger, J.M., Walter, J., Dinarello, C.A., Wolff, S.M., & Chedid, L. (1984). Sleep-promoting effects of endogenous pyrogen (interleukin-1). *Am J Physiol*, 246, R994-9.

Lapchak, P.A. (1992). A role for interleukin-2 in the regulation of striatal dopaminergic function. *Neuroreport*, 3, 165-168.

Lapchak, P.A., Araujo, D.M., Quirion, R., & Beaudet, A. (1991). Immunoautoradiographic localization of interleukin 2-like immunoreactivity and interleukin 2 receptors (Tac antigen-like immunoreactivity) in the rat brain. *Neuroscience*, 44, 173-184.

Laye, S., Bluthé, R.M., Kent, S., Combe, C., Medina, C., Parnet, P., Kelley, K., & Dantzer, R. (1995). Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am J Physiol*, 268, R1327-31.

Laye, S., Parnet, P., Goujon, E., & Dantzer, R. (1994). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 27, 157-162.

Leonard, E.J., Skeel, A., Yoshimura, T., & Rankin, J. (1993). Secretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by human mononuclear phagocytes. *Adv Exp Med Biol*, 351:55-64, 55-64.

Leonard, E.J., Yoshimura, T., Rot, A., Noer, K., Walz, A., Baggiolini, M., Walz, D.A., Goetzl, E.J., & Castor, C.W. (1991). Chemotactic activity and receptor binding of neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) and structurally related host defense cytokines: interaction of NAP-2 with the NAP-1 receptor. *J Leukoc Biol*, 49, 258-265.

Liebler, J.M., Kunkel, S.L., Burdick, M.D., Standiford, T.J., Rolfe, M.W., & Strieter, R.M. (1994). Production of IL-8 and monocyte chemoattractant peptide-1 by peripheral blood monocytes. Disparate responses to phytohemagglutinin and lipopolysaccharide. *J Immunol*, 152, 241-249.

Livingston, D.H., Appel, S.H., Sonnenfeld, G., & Malangoni, M.A. (1989). The effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on neutrophil function. *J Surg Res*, 46, 322-326.

Lomedico, P.T., Gubler, U., Hellmann, C.P., Dukovich, M., Giri, J.G., Pan, Y.C., Collier, K., Semionow, R., Chua, A.O., & Mizel, S.B. (1984). Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature*, 312, 458-462.

Lowe, J., MacLennan, K.A., Powe, D.G., Pound, J.D., & Palmer, J.B. (1989). Microglial cells in human brain have phenotypic characteristics related to possible function as dendritic antigen presenting cells. *J Pathol*, 159, 143-149.

Luheshi, G., Miller, A.J., Brouwer, S., Dascombe, M.J., Rothwell, N.J., & Hopkins, S.J. (1996). Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. *Am J Physiol*, 270, E91-5.

Lukacs, N.W., Chensue, S.W., Smith, R.E., Strieter, R.M., Warmington, K., Wilke, C., & Kunkel, S.L. (1994). Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. *Am J Pathol*, 144, 711-718.

Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Elner, V.M., Evanoff, H.L., Burdick, M., & Kunkel, S.L. (1994). Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte- derived MIP-1 alpha during monocyte-endothelial cell interactions. *Blood*, 83, 1174-1178.

MacNeil, B.J., Jansen, A.H., Greenberg, A.H., & Nance, D.M. (1996). Activation and selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin. *Am J Physiol*, 270, R264-70.

Maghazachi, A.A., al-Aoukaty, A., & Schall, T.J. (1994). C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. *J Immunol*, 153, 4969-4977.

Malipiero, U.V., Frei, K., & Fontana, A. (1990). Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes. *J Immunol*, 144, 3816-3821.

Maltman, J., Pragnell, I.B., & Graham, G.J. (1996). Specificity and reciprocity in the interactions between TGF-beta and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J Immunol*, 156, 1566-1571.

Matsuda, M., Tsukada, N., Miyagi, K., & Yanagisawa, N. (1995). Adhesion of lymphocytes to endothelial cells in experimental allergic encephalomyelitis before and after treatment with endotoxin lipopolysaccharide. *Int Arch Allergy Immunol*, 106, 335-344.

Matsumura, F., & Yamashiro, S. (1993). Caldesmon. *Curr Opin Cell Biol*, 5, 70-76.

McEwen, B.S., & Magarinos, A.M. (1997). Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci*, 821:271-84, 271-284.

Miller, A.J., Hopkins, S.J., & Luheshi, G.N. (1997). Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *Br J Pharmacol*, 120, 1274-1279.

Miller, L.G., & Fahey, J.M. (1994). Interleukin-1 modulates GABAergic and glutamatergic function in brain. *Ann N Y Acad Sci*, 739:292-8, 292-298.

Miller, M.D., & Krangel, M.S. (1992). Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol*, 12, 17-46.

Milner, B. (1972). Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg*, 19:421-46, 421-446.

Mink, R.B., & Johnston, J.A. (1996). Quantitative dot-immunoblot assay to measure protein in multiple brain samples. *Biotechniques*, 20, 809-811.

Moldawer, L.L., Andersson, C., Gelin, J., & Lundholm, K.G. (1988). Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant- derived cytokines. *Am J Physiol*, 254, G450-6.

Moldofsky, H., Lue, F.A., Eisen, J., Keystone, E., & Gorczynski, R.M. (1986). The relationship of interleukin-1 and immune functions to sleep in humans. *Psychosom Med*, 48, 309-318.

Morell, P., & Norton, W.T. (1980). Myelin. *Sci Am*, 242, 88-90, 92, 96 passim.

Morrow, L.E., McClellan, J.L., Klir, J.J., & Kluger, M.J. (1996). The CNS site of glucocorticoid negative feedback during LPS- and psychological stress-induced fevers. *Am J Physiol*, 271, R732-7.

Mucke, L., & Eddleston, M. (1993). Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. *FASEB J*, 7, 1226-1232.

Mullis, K.B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*, 48, 579-582.

Myers, R.D. (1981). Serotonin and thermoregulation: old and new views. *J Physiol (Paris)*, 77, 505-513.

Nockher, W.A., & Scherberich, J.E. (1997). Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro. *J Immunol*, 158, 1345-1352.

Norenberg, M.D. (1979). Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem*, 27, 756-762.

Olsson, I., Gatanaga, T., Gullberg, U., Lantz, M., & Granger, G.A. (1993). Tumour necrosis factor (TNF) binding proteins (soluble TNF receptor forms) with possible roles in inflammation and malignancy. *Eur Cytokine Netw*, 4, 169-180.

Olsson, T., Hakansson, A., & Seckl, J.R. (1997). Ketanserin selectively blocks acute stress-induced changes in NGFI-A and mineralocorticoid receptor gene expression in hippocampal neurons. *Neuroscience*, 76, 441-448.

Oppenheim, J.J. (1993). Overview of chemokines. *Adv Exp Med Biol*, 351:183-6, 183-186.

Ozawa, K., Suchanek, G., Breitschopf, H., Bruck, W., Budka, H., Jellinger, K., & Lassmann, H. (1994). Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain*, 117, 1311-1322.

Paul, N.L., & Ruddle, N.H. (1988). Lymphotoxin. *Annu Rev Immunol*, 6:407-38, 407-438.

Penfield, W. (1968). Engrams in the human brain. Mechanisms of memory. *Proc R Soc Med*, 61, 831-840.

Perry, V.H., & Gordon, S. (1988). Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci*, 11, 273-277.

Perry, V.H., Hume, D.A., & Gordon, S. (1985). Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15, 313-326.

Plata-Salaman, C.R., Oomura, Y., & Kai, Y. (1988). Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res*, 448, 106-114.

Pober, J.S., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L., Lapierre, L.A., Fiers, W., & Gimbrone, M.A., Jr. (1986). Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol*, 136, 1680-1687.

Pober, J.S., Gimbrone, M.A., Jr., Lapierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothlein, R., & Springer, T.A. (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*, 137, 1893-1896.

Pohlman, T.H., Stanness, K.A., Beatty, P.G., Ochs, H.D., & Harlan, J.M. (1986). An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J Immunol*, 136, 4548-4553.

Potchinsky, M., Nugent, P., Lafferty, C., & Greene, R.M. (1996). Effects of dexamethasone on the expression of transforming growth factor-beta in mouse embryonic palatal mesenchymal cells. *J Cell Physiol*, 166, 380-386.

Raff, M.C., Abney, E., Brockes, J.P., & Hornby-Smith, A. (1978). Schwann cell growth factors. *Cell*, 15, 813-822.

Ransohoff, R.M., Hamilton, T.A., Tani, M., Stoler, M.H., Shick, H.E., Major, J.A., Estes, M.L., Thomas, D.M., & Tuohy, V.K. (1993). Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J*, 7, 592-600.

Rathanaswami, P., Hachicha, M., Sadick, M., Schall, T.J., & McColl, S.R. (1993). Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J Biol Chem*, 268, 5834-5839.

Ray, A., Siegel, M.D., Prefontaine, K.E., & Ray, P. (1995). Anti-inflammation: direct physical association and functional antagonism between transcription factor NF-KB and the glucocorticoid receptor. *Chest*, 107, 139S

Riley, L.A., & Bernstein, J.J. (1996). Changes in dynamin and actin mRNA expression in the dorsal column- medial lemniscal system following dorsal column lesion. *J Neurosci Res*, 44, 47-51.

Rollins, B.J., Walz, A., & Baggiolini, M. (1991). Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*, 78, 1112-1116.

Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S.C., Schall, T.J., & Dahinden, C.A. (1992). RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med*, 176, 1489-1495.

Saneto, R.P., Chiappelli, F., & de Vellis, J. (1987). Interleukin-2 inhibition of oligodendrocyte progenitor cell proliferation depends on expression of the TAC receptor [published erratum appears in *J Neurosci Res* 1990 Mar;25(3):441]. *J Neurosci Res*, 18, 147-154.

Saper, C.B., & Breder, C.D. (1992). Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response. *Prog Brain Res*, 93:419-28; *discussion*, 419-28; discussion 428-9.

Sasseville, V.G., Smith, M.M., Mackay, C.R., Pauley, D.R., Mansfield, K.G., Ringler, D.J., & Lackner, A.A. (1996). Chemokine expression in simian immunodeficiency virus-induced AIDS encephalitis. *Am J Pathol*, 149, 1459-1467.

Sauer, J., Castren, M., Hopfner, U., Holsboer, F., Stalla, G.K., & Arzt, E. (1996). Inhibition of lipopolysaccharide-induced monocyte interleukin-1 receptor antagonist synthesis by cortisol: involvement of the mineralocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 73-79.

Sawada, M., Suzumura, A., & Marunouchi, T. (1995). Induction of functional interleukin-2 receptor in mouse microglia. *J Neurochem*, 64, 1973-1979.

Schall, T.J. (1991). Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine*, 3, 165-183.

Schall, T.J., & Bacon, K.B. (1994). Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol*, 6, 865-873.

Schall, T.J., Jongstra, J., Dyer, B.J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M.M., & Krensky, A.M. (1988). A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol*, 141, 1018-1025.

Schoester, M., Heinrich, P.C., & Graeve, L. (1994). Regulation of interleukin-6 receptor expression by interleukin-6 in human monocytes--a re-examination. *FEBS Lett*, 345, 131-134.

Scotte, M., Hiron, M., Masson, S., Lyoumi, S., Banine, F., Teniere, P., Lebreton, J.P., & Daveau, M. (1996). Differential expression of cytokine genes in monocytes, peritoneal macrophages and liver following endotoxin- or turpentine-induced inflammation in rat. *Cytokine*, 8, 115-120.

Selmaj, K., Raine, C.S., Farooq, M., Norton, W.T., & Brosnan, C.F. (1991). Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol*, 147, 1522-1529.

Selmaj, K.W., & Raine, C.S. (1988). Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol*, 23, 339-346.

Seto, D., Kar, S., & Quirion, R. (1997). Evidence for direct and indirect mechanisms in the potent modulatory action of interleukin-2 on the release of acetylcholine in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol*, 120, 1151-1157.

Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., & Calvin, D. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359, 693-699.

Smith, W.B., Noack, L., Khew-Goodall, Y., Isenmann, S., Vadas, M.A., & Gamble, J.R. (1996). Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol*, 157, 360-368.

Spanakis, E., & Brouty-Boye, D. (1994). Evaluation of quantitative variation in gene expression. *Nucleic Acids Res*, 22, 799-806.

Speziale, S.C., & Smith, R.J. (1985). Effects of soluble stimuli on human monocyte secretion. *Clin Immunol Immunopathol*, 36, 60-69.

Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Phan, S.H., Rollins, B.J., & Strieter, R.M. (1991). Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem*, 266, 9912-9918.

Stein, M.B., Koverola, C., Hanna, C., Torchia, M.G., & McClarty, B. (1997). Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse [In Process Citation]. *Psychol Med*, 27, 951-959.

Stellato, C., Beck, L.A., Gorgone, G.A., Proud, D., Schall, T.J., Ono, S.J., Lichtenstein, L.M., & Schleimer, R.P. (1995). Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids. *J Immunol*, 155, 410-418.

Suzumura, A., Mezitis, S.G., Gonatas, N.K., & Silberberg, D.H. (1987). MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain: induction of Ia antigen expression by gamma- interferon. *J Neuroimmunol*, 15, 263-278.

Symons, J.A., Eastgate, J.A., & Duff, G.W. (1990). A soluble binding protein specific for interleukin 1 beta is produced by activated mononuclear cells. *Cytokine*, 2, 190-198.

Symons, J.A., Eastgate, J.A., & Duff, G.W. (1991). Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. *J Exp Med*, 174, 1251-1254.

Taishi, P., Bredow, S., Guha-Thakurta, N., Obal, F., Jr., & Krueger, J.M. (1997). Diurnal variations of interleukin-1 beta mRNA and beta-actin mRNA in rat brain. *J Neuroimmunol*, 75, 69-74.

Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., & Kelvin, D.J. (1993). Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science*, 260, 355-358.

Taub, D.D., & Oppenheim, J.J. (1994). Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol*, 1, 229-246.

Terao, A., Oikawa, M., & Saito, M. (1994). Tissue-specific increase in norepinephrine turnover by central interleukin-1, but not by interleukin-6, in rats. *Am J Physiol*, 266, R400-4.

Tower, D.B. (1973). The role of astroglia as modulators of neuronal function in cerebral cortex: comparative data, and observations in vivo and in vitro in fluid, electrolyte and amino acid interrelationships. *Vopr Biokhim Mozga*, 8:269-88, 269-288.

Trifaró, J.M., Vitale, M.L., & Rodríguez Del Castillo, A. (1992). Cytoskeleton and molecular mechanisms in neurotransmitter release by neurosecretory cells. *Eur J Pharmacol*, 225, 83-104.

Tso, J.Y., Sun, X.H., & Wu, R. (1985). Structure of two unlinked *Drosophila melanogaster* glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem*, 260, 8220-8228.

Turnbull, A.V., Pitossi, F.J., Lebrun, J.J., Lee, S., Meltzer, J.C., Nance, D.M., del Rey, A., Besedovsky, H.O., & Rivier, C. (1997). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha action within the CNS markedly reduces the plasma adrenocorticotropin response to peripheral local inflammation in rats. *J Neurosci*, 17, 3262-3273.

Uht, R.M., Anderson, C.M., Webb, P., & Kushner, P.J. (1997). Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element. *Endocrinology*, 138, 2900-2908.

Uno, H., Eisele, S., Sakai, A., Shelton, S., Baker, E., DeJesus, O., & Holden, J. (1994). Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav*, 28, 336-348.

Vallières, L., Lacroix, S., & Rivest, S. (1997). Influence of interleukin-6 on neural activity and transcription of the gene encoding corticotrophin-releasing factor in the rat brain: an effect depending upon the route of administration [In Process Citation]. *Eur J Neurosci*, 9, 1461-1472.

VanOtteren, G.M., Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Danforth, J.M., Burdick, M.D., Abruzzo, L.V., & Strieter, R.M. (1994). Expression and regulation of macrophage inflammatory protein-1 alpha by murine alveolar and peritoneal macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10, 8-15.

Vass, K., & Lassmann, H. (1990). Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol*, 137, 789-800.

Wahl, S.M., Allen, J.B., McCartney-Francis, N., Morganti-Kossmann, M.C., Kossmann, T., Ellingsworth, L., Mai, U.E., Mergenhagen, S.E., & Orenstein, J.M. (1991). Macrophage- and astrocyte-derived transforming growth factor beta as a mediator of central nervous system dysfunction in acquired immune deficiency syndrome. *J Exp Med*, 173, 981-991.

Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wong, H.L., Dougherty, S., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Ellingsworth, L., Schmidt, J.A., Hall, G., & Roberts, A.B. (1988). Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol*, 140, 3026-3032.

Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H., & Baggiolini, M. (1987). Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 149, 755-761.

Watkins, L.R., Wiertelak, E.P., Goehler, L.E., Smith, K.P., Martin, D., & Maier, S.F. (1994). Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res*, 654, 15-26.

Wong, D., & Dorovini-Zis, K. (1992). Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*, 39, 11-21.

Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-556.

Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., & Worley, P.F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11, 371-386.

Yasui, M., Nakao, A., Yuuki, T., Harada, A., Nonami, T., & Takagi, H. (1995). Immunohistochemical detection of endotoxin in endotoxemic rats. *Hepatogastroenterology*, 42, 683-690.

Yokota, S., Geppert, T.D., & Lipsky, P.E. (1988). Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 140, 531-536.

Zalcman, S., Green-Johnson, J.M., Murray, L., Nance, D.M., Dyck, D., Anisman, H., & Greenberg, A.H. (1994). Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin- 1, -2 and -6. *Brain Res*, 643, 40-49.

Zucker-Franklin, D., Warfel, A., Grusky, G., Frangione, B., & Teitel, D. (1987). Novel monocyte-like properties of microglial/astroglial cells. Constitutive secretion of lysozyme and cystatin-C. *Lab Invest*, 57, 176-185.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AP-1	activator protein-1
APC	antigen-presenting cell
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
cpm	counts per minute
CRF	corticotropin releasing hormone
CRP	c-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidintetrahydroxychlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreithol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FCS	fetal calf serum
GABA	γ -Aminobuttersäure
G-CSF	granulocyte-colony-stimulating factor
GCR	Glukokortikoidrezeptor
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
Gro	growth-related
HPA	Hypothalamus-Pituitary gland-Adrenal gland
i.c.v.	intrazentriventrikulär
i.p	intraperitoneal
ICAM	intercellular adhesion molecule

IFN	Interferon
I- κ B	inhibitory factor kappa B
IL-	Interleukin-
IL-1-R	Interleukin-1-Rezeptor
IP-10	inducible protein-10
kDa	Kilodalton
LFA-1	leukocyte function antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte-Chemoattractant-Protein-1
MCR	mineralocorticoidreceptor
MHC	major histocompatibility complex
MIP-1 α	Macrophage-Inflammatory-Protein-1 α
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
NAP-1	neutrophil activating protein-1
NK- κ B	nuclear factor kappa B
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
OD	optische Dichte
PBL	periphere Blutleukozyten
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed
RT-PCR	reverse transcriptase - polymerase chain reaction
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
TGF- β	Transforming-Growth-Factor- β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRIS	Tris-hydroxymethylamino-methan
VLA-4	very late antigen-4
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Wesemann danke ich herzlich für die herausfordernde Fragestellung aus dem Bereich der Neurochemie und die Ermöglichung meiner Promotion im Rahmen eines Projektes der Volkswagen-Stiftung.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Gemsa bedanke ich mich für die theoretische und praktische Unterstützung bei der Ausführung der immunologisch orientierten Experimente.

Herrn Prof. Dr. B. Kadenbach danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Mein herzlicher Dank gilt den Mitarbeitern aus dem Tier-OP: Anja Jüngst, Thomas Damm und Heribert Nau, welche mir gegenüber eine enorme Geduld und Hilfsbereitschaft aufbrachten.

Für ihre selbstlose Mithilfe bei der Durchführung immunhistochemischer Arbeiten danke ich Anke Friedetzky und Andreas Meinhard.

Für interessante und inspirierende Gespräche auf dem Gebiet der Wissenschaft danke ich Marianne Nain, Cordula Ruwe, Michael Bacher, Hans-Willi Clement, Holger Garn, Christoph Grote, Peter Hofmann und Andreas Kaufmann.

Vielen Dank sage ich den unermüdlichen Organisatoren Ruth Jäger, Gerda Jansonius, Elfriede Pruß, Elfi Rischkowsky und Erika Rösing, welche sich um den reibungslosen Ablauf des Wissenschaftsbetriebes sorgten.

Herrn Schmitz danke ich für sein Verständnis, daß der Abschluß einer solchen Arbeit sich nicht genau terminieren läßt.

Herzlichen Dank sei den Mitgliedern des „philosophischen Gesprächskreises“ gesagt, welche sich jahrelang in brüderlicher Nachsicht mit meinem arbeitsbedingten chronischen Zeitmangel übten.

Herzlichen Dank besonders Dir, Andrea, für die tatkräftige Unterstützung und Bestärkung in einer nicht gerade einfachen Zeit.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter, meinem verstorbenen Vater und meinen Großeltern, ohne deren Hilfe dieses Studium nicht möglich gewesen wäre.